

**Entwicklung eines Verfahrens
zur kontinuierlichen, gerichteten Evolution
hochaffiner Protein-Liganden *in vitro***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Maren Meysing
aus Magdeburg

1. Referent: Professor Dr. Stefan Dübel

2. Referent: Professor Dr. Ralf Wagner

eingereicht am: 09.08.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 14.10.2010

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Freischmidt, A., Meysing, M., Liss, M., Wagner, R., Kalbitzer, H.R., Horn, G. (2010). *Limiting factors of the translation machinery*. J Biotechnol. 2010 Oct 1;150(1):44-50.

Tagungsbeiträge

Meysing, M., Schlüsener, D., Liss, M., Wagner, R. (2009). *Development of an in vitro system for continuous directed evolution of high affinity protein ligands* (Poster). Enzyme Engineering XX, Groningen, Niederlande.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Übernahme des Erstgutachtens meiner extern angefertigten Doktorarbeit.

Mein außerordentlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Möglichkeit zur Promotion bei der GENEART AG, für die wissenschaftliche Unterstützung und die Bereitschaft zu anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Michael Steinert danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich danke Dr. Michael Liss für die Betreuung, die Diskussion der Ergebnisse, die kreative Unterstützung und die Korrektur der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer danke ich für die Bereitschaft zur Kooperation.

Dr. Gudrun Horn und Axel Freischmidt aus der AG Kalbitzer danke ich für die Einarbeitung in die *E. coli* Lysat-Herstellung und die Bereitstellung der Lysat-Variationen.

Für die wunderbare und einmalige Arbeitsatmosphäre, sowie die Unterstützung in allen Lebenslagen danke ich Claudia Benkel, Kathrin Brunner, Dr. Daniela Daubert, Dr. Stephan Fath, Elisabeth Graf, Dr. Melanie Heinrich und Dr. Kristina Kliche. Besonders bei Daniela möchte ich mich für ihre kreativen Ideen und die tatkräftige Unterstützung bei der Realisierung dieses Projekts bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an meine Familie und meine Freunde, es ist schön zu wissen, dass immer jemand hinter einem steht.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 EVOLUTION	1
1.2 GERICHTETE EVOLUTION	3
1.3 NUKLEINSÄURE-AMPLIFIKATIONSMETHODEN	6
1.3.1 NASBA	7
1.4 IN VITRO PROTEINEXPRESSION.....	9
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIAL	13
2.1.1 Verbrauchsmaterial	13
2.1.2 Laborausstattung.....	13
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.4 Puffer und Lösungen	15
2.1.5 Bakterienstämme	17
2.1.6 Medien zur Kultivierung von Bakterien.....	17
2.1.7 Plasmide.....	17
2.1.8 Oligonukleotide.....	17
2.1.9 Größenstandards für die Elektrophorese	19
2.1.10 Enzyme.....	19
2.1.11 Antikörper, Antikörperkonjugate und Antikörperseren	20
2.1.12 Kit-Systeme	20
2.1.13 Säulenmaterial und magnetische Partikel.....	20
2.1.14 Computerprogramme	20
2.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	21
2.2.1 Lagerung von <i>Escherichia coli</i> -Kulturen.....	21
2.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	21
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	22
2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese	22
2.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	22
2.3.3 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
2.3.4 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen	22
2.3.5 Aufkonzentrierung von DNA.....	22

2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion	23
2.3.7	Restriktionsverdau von DNA	23
2.3.8	Dephosphorylierung von DNA.....	24
2.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	24
2.3.10	DNA Sequenzierung.....	24
2.3.11	Generierung eines NASBA-Templates	24
2.3.12	<i>In vitro</i> Transkription.....	24
2.3.13	NASBA	25
2.3.14	Denaturierende PAGE.....	25
2.3.15	Southern Blot.....	26
2.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	26
2.4.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	26
2.4.2	Proteinexpression mit dem PURE System.....	27
2.4.3	Herstellung von <i>E. coli</i> Lysaten und Ribosomenfraktionen.....	27
2.4.4	Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung	27
2.4.5	Fraktionierung von <i>E. coli</i> Lysat mittels Gelfiltration	28
2.4.6	SDS-PAGE	28
2.4.7	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	28
2.4.8	Western Blot und Immunfärbung	28
2.4.9	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	29
2.4.10	ELISA	29
2.4.11	Aktivitätstest mit dem <i>RetroSys™ C-Type RT Activity Kit</i>	30
3	ERGEBNISSE.....	31
3.1	NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION (NASBA)	31
3.1.1	<i>In vitro</i> Transkription.....	31
3.1.2	NASBA	32
3.1.3	Reverse Transkription	34
3.1.4	Einfluss der Inkubationszeit	35
3.1.5	Bestimmung der optimalen Inkubationstemperatur	35
3.1.6	Bestimmung der optimalen Template-Konzentration	36
3.1.7	Visualisierung der NASBA-Kinetik mit DNA-interkalierenden Agenzien	37
3.1.8	Optimierung des NASBA <i>Forward</i> -Oligonukleotids	38
3.1.9	Einfluss von Dimethylsulfoxid.....	38
3.1.10	Reaktionsbedingungen für DNA-Templates größer 2,0 kb	40
3.1.11	Einfluss von Additiven auf die NASBA mit Templates größer 2,0 kb.....	41
3.1.12	Limitationen der NASBA.....	42
3.1.13	Zusammenfassung.....	44
3.2	T7 RNA POLYMERASE UND DEREN FUSIONSPROTEINE.....	45
3.2.1	Expression und Aufreinigung der T7 RNA Polymerase	45
3.2.2	T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine.....	46
3.2.3	Expression und Aufreinigung der T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine	47

3.2.4	Aktivitätstests der T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine	47
3.2.5	Zusammenfassung	49
3.3	<i>MOLONEY MURINE LEUKAEMIA VIRUS</i> REVERSE TRANSKRIPTASE	50
3.3.1	Vergleich von verschiedenen optimierten MMuLV RTs	50
3.3.2	MMuLV RT als Fusionsprotein	51
3.3.3	Aktivitätstest der MMuLV RT-Fusionsproteine	52
3.3.4	Zusammenfassung	53
3.4	KOMBINATION NASBA UND <i>IN VITRO</i> PROTEINSYNTHESE	54
3.4.1	Inhibierung der NASBA durch <i>E. coli</i> Lysat	55
3.4.2	Zusammensetzung von NASBA und PURE System	58
3.4.3	Versuchs-Aufbau zur Kombination von NASBA und PURE System	59
3.4.4	Optimale Template-Konzentration im PURE System	59
3.4.5	Einfluss von NASBA-Komponenten auf das PURE System	60
3.4.6	Magnesiumionen- und dNTP-Konzentration	61
3.4.7	Die endogen exprimierte MMuLV RT ist aktiv	63
3.4.8	Funktioneller, kombinierter Ansatz von NASBA und PURE System	64
3.4.9	Kinetik des kombinierten Ansatzes	65
3.4.10	Nachweis der Proteinexpression von NASBA-Produkt	66
3.4.11	Zusammenfassung	67
3.5	SELEKTION UND MUTATIONSANALYSE	68
3.5.1	NASBA in der Kapillare	68
3.5.2	Serieller Transfer der NASBA	69
3.5.3	Mutationsanalyse der NASBA-Produkte	69
3.5.4	Anwendung der Kombination von NASBA und PURE Δ T7 RNAP System	72
3.5.5	Mutationsanalyse des kombinierten Ansatzes	73
3.5.6	Anreicherungstest „ <i>survival of the fittest</i> “	74
3.5.7	Affinitäten zwischen T7 RNAP- und MMuLV RT-Varianten	76
3.5.8	Zusammenfassung	78
4	DISKUSSION	79
4.1	GERICHTETE EVOLUTION	79
4.2	REPLIKATION	79
4.2.1	NASBA	79
4.2.2	Kombination NASBA und <i>in vitro</i> Proteinsynthese	82
4.3	MUTATION	84
4.4	SELEKTION	87
4.5	DAS <i>IN VITRO</i> EVOLUTIONSSYSTEM: LIMITATIONEN UND CHANCEN	89
4.6	AUSBLICK	92
5	ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	94
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	94
5.2	ABSTRACT	95

6 LITERATURVERZEICHNIS.....	96
7 ANHANG.....	108
7.1 VEKTORKARTEN	108
7.2 OPTIMIERTE GENSEQUENZEN.....	109
7.3 TEMPLATES.....	111

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Evolutionsprinzips	1
Abb. 2: Darstellung verschiedener Methoden zur Genotyp-/Phänotyp-Kopplung (verändert aus Matsuura & Yomo (2006)).....	4
Abb. 3: Schematischer Ablauf der NASBA	7
Abb. 4: Die vier Hauptreaktionen in einem <i>in vitro</i> Proteinexpressionssystem (verändert aus Shimizu <i>et al.</i> (2005)).....	10
Abb. 5: Schematische Darstellung des Verfahrens zur kontinuierlichen, zielgerichteten Evolution hochaffiner Protein-Liganden <i>in vitro</i>	11
Abb. 6: Optimale Mg^{2+} -Konzentration in der <i>in vitro</i> Transkription.....	32
Abb. 7: Schematischer Ablauf der NASBA in dieser Arbeit	32
Abb. 8: Analyse der NASBA.....	33
Abb. 9: Test verschiedener RTs zur Verwendung in der NASBA	34
Abb. 10: Einfluss der Inkubationszeit auf die NASBA	35
Abb. 11: Bestimmung der optimalen Inkubationstemperatur der NASBA	36
Abb. 12: Bestimmung der optimalen Template-Konzentration in der NASBA	36
Abb. 13: Visualisierung der DNA-Amplifikation in der NASBA.....	37
Abb. 14: Optimierung des NASBA <i>Forward</i> -Oligonukleotids	38
Abb. 15: Einfluss von DMSO auf die NASBA.....	39
Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der NASBA in Abhängigkeit von DMSO	39
Abb. 17: NASBA Reaktionsbedingungen für DNA-Templates größer 2,0 kb	40
Abb. 18: Einfluss von Betain und Trehalose auf die NASBA	42
Abb. 19: Einbau der Oligonukleotide während der NASBA	43
Abb. 20: Analyse des NASBA-Produktes mittels Restriktionsverdau	44
Abb. 21: Aufreinigung der T7 RNAP mit verschiedenen Affinitäts-Tags.....	46
Abb. 22: Aufreinigung der T7 RNAP-Fusionsproteine	47
Abb. 23: <i>In vitro</i> Transkription mit den T7 RNAP-Fusionsproteinen	48
Abb. 24: <i>In vitro</i> Transkription/Translation mit den T7 RNAP-Fusionsproteinen und dem PURE Δ T7 RNAP System	49
Abb. 25: Vergleich von verschieden optimierten MMuLV RTs.....	51
Abb. 26: Vergleich der MMuLV RT-Fusionskonstrukte	52
Abb. 27: Aktivitätstest der MMuLV RT-Fusionsproteine	53
Abb. 28: Bestimmung eines <i>in vitro</i> Proteinsynthesystems bzw. -Lysats zur Kombination mit der NASBA.....	54
Abb. 29: Inhibierung der NASBA durch <i>E. coli</i> Lysat	55
Abb. 30: Fraktionierung des <i>E. coli</i> Lysats mittels Gelfiltration	56
Abb. 31: Detektion der <i>E. coli</i> DNA Polymerase I.....	57
Abb. 32: Optimale Template-Konzentration für das PURE System.....	59
Abb. 33: Proteinexpression mit dem PURE System plus Sekundärstruktur-reduzierende Additive	60

Abb. 34: PURE System mit NASBA Komponenten	61
Abb. 35: Magnesium- und dNTP-Konzentration in der Kombination von NASBA und PURE	62
Abb. 36: Nachweis der aktiven, endogen exprimierten MMuLV RT in einem kombinierten Ansatz aus NASBA und PURE System	63
Abb. 37: Zeitliche Analyse des kombinierten Ansatzes	65
Abb. 38: Nachweis der Proteinexpression von NASBA-Produkt	67
Abb. 39: Serieller Transfer der NASBA	69
Abb. 40: Mutationsanalyse der NASBA-Produkte	70
Abb. 41: Schematische Darstellung der Mutationen im offenen Leserahmen des NASBA- Produkts (MMuLV RT)	71
Abb. 42: Kombinierte Ansätze von NASBA und PURE System mit einem Transfer	72
Abb. 43: Mutationsanalyse des PURE::NASBA-Produkts (MMuLV RT)	73
Abb. 44: Test auf Anreicherung der Yes1mut-MMuLV RT in PURE::NASBA-Ansätzen	74
Abb. 45: Test auf Anreicherung der Strep-MMuLV RT in PURE::NASBA-Ansätzen	76
Abb. 46: Affinität zwischen T7 RNAP (NEB) und MMuLV RT (NEB)	77
Abb. 47: Affinitäten der einzelnen T7 RNAP- und MMuLV RT-Varianten zueinander	78
Abb. 48: Modell eines unvollständigen RNA-Abbaus während der cDNA-Synthese	84
Abb. 49: Vektorkarte pSc-Renilla	108
Abb. 50: Vektorkarte pEVHN	108
Abb. 51: Vektorkarte pEVHis-StrepCore13-139	109

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BrdUTP	Bromodesoxyuridintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
CIP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> , Alkalische Phosphatase
C-terminal	Carboxylgruppen-terminal
Da	Dalton
DAB	3'3-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	EDTA-Borsäure
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-Tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELOSA	<i>Enzyme-linked oligosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FDG	<i>Fluorescein-β-D-galactopyranoside</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
x g	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IMAC	<i>Immobilised metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
K _d	Dissoziationskonstante
L	Liter
m	milli
M	Molar
MCS	<i>Multiple cloning site</i> , Multiple Klonierungsstelle

min	Minute
MMuLV	<i>Moloney murine leukaemia virus</i>
ms	Millisekunde
mut	Mutante
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
μ	mikro
n	nano
NASBA	<i>Nucleic acid sequence-based amplification</i>
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NTP	Nukleosidtriphosphat
N-terminal	Aminogruppen-terminal
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PURE	<i>Protein synthesis using recombinant elements</i>
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
Sam68	<i>src-associated protein during mitosis of 68 kDa</i>
scFv	<i>Single chain fragment variable</i>
T7 RNAP	T7 RNA Polymerase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
U	<i>Unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	<i>Volume to volume</i> , Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	<i>Weight to volume</i> , Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Evolution

Charles Darwin veröffentlichte vor mehr als 150 Jahren die von ihm entwickelte Evolutionstheorie „*On the Origin of Species by Means of Natural Selection*“ (Darwin, 1859). Seine Theorie über die Entwicklung und Vielfalt des Lebens beruht auf den drei Prinzipien: Vererbung (Replikation/Amplifikation), Veränderung (Mutation) und Auslese (Selektion) (Abb. 1). Darwins Theorie besagt, dass diejenige Spezies bevorzugt überlebt, die sich ihrer Umwelt am besten anpassen kann.

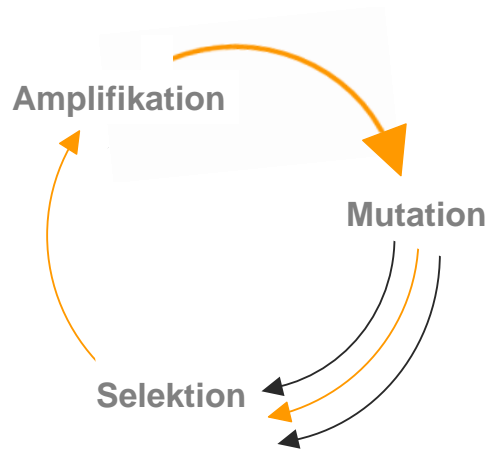


Abb. 1: Schematische Darstellung des Evolutionsprinzips

Im Amplifikationsschritt bringen Moleküle eine größere Anzahl an Tochtermolekülen hervor. Dabei werden Veränderungen (Mutationen) in die genetische Information eingebracht. Die entstandenen Varianten werden mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit, je nach evolutiver Anforderung im System, für weitere Amplifikationen selektiert (nach Joyce (2007)).

Ausgehend von einer chemischen Ursuppe niederer Moleküle (Miller & Urey, 1959) fand über einen Zeitraum von circa vier Milliarden Jahren die Evolution hoch-komplexer Lebensformen statt, die letztendlich zur Entwicklung des Menschen führte.

Die bedeutendste Vorläufer-Form aller heute existierenden Lebensformen ist die RNA. Die von Walter Gilbert postulierte Hypothese einer RNA-Welt, in der alle essentiellen Funktionen von Ribonukleinsäuren übernommen wurden, beruht auf der Tatsache, dass RNA in der Lage ist, die Speicherung genetischer Informationen und die Katalyse von Reaktionen in einem Molekül zu vereinen (Gilbert, 1986). Eine Untermauerung der RNA-Welt-Theorie stellt die 1967 von Sol Spiegelman veröffentlichte Pionierarbeit dar, in der erstmals die extrazelluläre Evolution von RNA-Molekülen in einem Q β -Replikase-System beschrieben wird (Mills *et al.*, 1967). Der hin zu schnellerer Replikation angelegte Selektionsdruck verursachte dabei die Entstehung stark verkürzter RNA-Moleküle, die zwar die Erkennungssequenz der Q β -Replikase enthielten, aber auf unnötige, die Replikation verlangsamende, Sequenzabschnitte und Sekundärstrukturen verzichteten (Mills *et al.*, 1967).

Bei der Arbeit an RNA-Transkripten entdeckten Thomas Cech und Sidney Altman, dass RNA katalytische Eigenschaften besitzen kann und erhielten dafür 1989 den Nobelpreis für Chemie (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Verschiedene lebensnotwendige Reaktionen werden von katalytisch-aktiven RNA-Molekülen (Ribozymen) durchgeführt. Neben der Knüpfung von Phosphodiesterbindungen zur eigenen Reproduktion und Synthese, kommt der Knüpfung von Peptidbindungen eine besondere Bedeutung zu. Die Entdeckung, dass im Zentrum von Ribosomen die Verkettung der Aminosäuren zu Polypeptiden von einer RNA mit Peptidyltransferaseaktivität katalysiert wird (Ban *et al.*, 2000), kennzeichnet den Übergang von der RNA-Welt in die Peptid-basierten Lebensformen. Damit stellen Ribozyme in der heutigen Zeit eine Art lebende Fossilie eines längst vergangenen Lebens dar, das ursprünglich auf Nukleinsäuren basierte.

Was die Natur über einen Zeitraum von mehreren Milliarden Jahren vollbracht hat, kann heutzutage im Labormaßstab, wenn auch in begrenztem Umfang, aber mit deutlich geringerem Zeitaufwand, nachgestellt werden. Vor allem in der Industrie und Medizin existiert eine ständig wachsende Nachfrage nach Biomolekülen mit optimierter Thermostabilität, rekombinanter Expression, Substratspezifität und hoher intrinsischer Aktivität, auch unter suboptimalen Bedingungen. Die Kenntnisse der Proteomik reichen bisher nicht aus, um eine zutreffende Vorhersage zu liefern, inwiefern ein Biomolekül modifiziert werden muss, um die gewünschten Eigenschaften hervorzubringen.

Die *in vitro* Evolution bietet die Möglichkeit nicht-optimale, natürlich-vorkommende Proteine und Nukleinsäuren nach den Prinzipien von Darwin zu modifizieren. Dieser, auch als gerichtete Evolution bezeichnete, Prozess beinhaltet zunächst die Generierung einer großen Anzahl an Protein- oder Genvarianten und anschließend die Selektion der Variante mit neuer, gewünschter Eigenschaft. Dabei ist die Anzahl theoretisch möglicher Varianten astronomisch groß: für ein 300 Aminosäuren großes Protein, das an 20 zufälligen Positionen modifiziert werden soll, existieren 7×10^{74} mögliche Varianten - eine das Universum sprengende Masse an Molekülen.

Eine Vielzahl an Methoden zum systematischen *Screening* wurde entwickelt, die aber allesamt auf eine Variantenanzahl von $10^6 - 10^{12}$ begrenzt sind. Da die Evolution nach Darwin auf einem kontinuierlichen Prozess beruht und die bisher verfügbaren Methoden diskontinuierlich ablaufen - Generierung der Varianten plus nachgelagerter Selektion - findet kein „echter“ Evolutionsprozess statt. Mit der Entwicklung eines kontinuierlichen *in vitro* Evolutionssystems - bestehend aus einem Zyklus aus Mutation, Selektion und Replikation - kann die natürliche Evolution nach den Prinzipien von Darwin annähernd imitiert werden. Dabei könnte die limitierende Variantenanzahl umgangen und aus einem schier unerschöpflichen Pool evolvierender Moleküle die optimalste Variante identifiziert werden. Solch ein Evolutionssystem sollte neben einer optimalen Mutationsrate, eine verlässliche Genotyp-Phänotyp-Kopplung und einen angemessenen Selektionsschritt enthalten.

1.2 Gerichtete Evolution

Der erste Schritt zur gerichteten Evolution ist die Generierung einer möglichst großen Anzahl an Varianten, einer sogenannten Bibliothek. Bei der zufälligen Mutagenese werden beispielsweise mittels *error-prone* PCR (Cadwell & Joyce, 1992) Mutationen in das DNA-Template eingebracht. Diese Mutationen erzeugen auf Proteinebene, aufgrund des von der Natur vorgegebenen genetischen Kodes, größtenteils stille Mutationen oder neutrale Aminosäure-Austausche (Hida *et al.*, 2007). Finden „echte“ Mutationen statt, haben diese meist eine eher nachteilige Wirkung auf das Protein, so dass der Anteil funktioneller Proteine in einer *error-prone* PCR-generierten Bibliothek mit zunehmender Mutationsrate exponentiell abnimmt (Suzuki *et al.*, 1996). Eine optimale Mutationsrate sollte neben einer ausreichenden Diversität auch genügend funktionelles Protein erzeugen.

Eine Methode, bei der nur potentiell funktionelle Bereiche in einem Protein mutiert werden, ist die Kassettenmutagenese. Dabei werden mittels degenerierter Oligonukleotide die Mutationen gezielt in einen bestimmten Genabschnitt eingebracht (Wells *et al.*, 1985; Oliphant *et al.*, 1986). Neben der auf einen funktionellen Proteinbereich fokussierten Diversität, bietet diese Methode die Möglichkeit, Mutationen zu generieren, die aufgrund des degenerierten genetischen Kodes mittels *error-prone* PCR sehr unwahrscheinlich oder gar nicht möglich wären. Nachteil der Kassettenmutagenese ist, dass unerwartete, aber eventuell vorteilhafte Mutationen in anderen Regionen des Proteins ausgeschlossen werden (Hida *et al.*, 2007).

Eine weitere Methode zur Generierung einer Genvarianten-Bibliothek ist das *DNA-Shuffling*, das auf der Fragmentierung homologer Genabschnitte und deren Neukombination mittels Überhang-PCR beruht (Stemmer, 1994). Dabei kommt es zur Generierung von Proteinvarianten, die mehrere vorteilhafte Funktionen der vorhergehenden Varianten rekombinieren. Die Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Varianten sind im Vergleich zur Kassetten- oder Zufallsmutagenese facettenreicher. Da auf das Einbringen von Aminosäuren, die vorher nicht im Protein vorhanden waren, verzichtet wird, entstehen zu einem größeren Anteil funktionelle und eventuell verbesserte Proteinvarianten.

Nach der Generierung einer Variantenbibliothek erfolgt die Selektion der verbesserten Proteinvariante. Die Voraussetzung dafür ist eine physische Kopplung von Genotyp und Phänotyp, um nach der Selektion der Proteinvariante deren genetische Information zu erhalten. Die Präsentation von Peptiden oder Proteinen auf der Oberfläche von Zellen, Viren oder Makromolekülen (z. B. Ribosomen) hat sich als besonders hilfreich bei der Evolution von Proteinen hinsichtlich ihrer Bindeaktivitäten erwiesen (siehe Abb. 2).

Beim *Phagen-Display* werden die Proteinvarianten auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen, beispielsweise fusioniert an das Phagenhüllprotein pIII, präsentiert (Smith, 1985). Die genetische Information der Proteinvariante und des Phagenhüllproteins pIII sind in einem offenen Leserahmen auf einem sogenannten Phagemid kodiert. Die Präsentation des Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche und die Verpackung dessen genetischer Information ermöglicht die Genotyp-Phänotyp-Kopplung. Nach Selektion des, an einen spezifischen Liganden bindenden, Phagen kann dessen Genotyp für analytische Zwecke oder eine erneute Selektionsrunde bestimmt werden. Vor allem für die Präsentation von Antikörper-Bibliotheken

hat sich das Phagen-*Display* als eine robuste Methode etabliert, mit der Antikörper-Bibliotheken mit mehr als 10^9 verschiedenen Klonen generiert werden können (Hust & Dübel, 2004). Ergänzend zum Phagen-*Display* wurden andere zellbasierte *Display*-Techniken entwickelt. So können Proteinbibliotheken, als Fusion an membranassoziierte Proteine, auf der Oberfläche von Hefen oder *E. coli*-Zellen präsentiert und mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Technologie in Form eines *high-throughput screenings* selektiert werden (Georgiou *et al.*, 1997; Boder & Wittrup, 1997). Je nach Transformationseffizienz der verwendeten Zellen können Bibliotheken mit einer Variantenanzahl $< 10^8$ generiert werden (Leemhuis *et al.*, 2005). Weitere Limitationen bei der Proteinpräsentation ergeben sich aufgrund von Konformationseinschränkungen, der Anfälligkeit gegenüber Proteasen und den Behinderungen durch sterische Effekte.

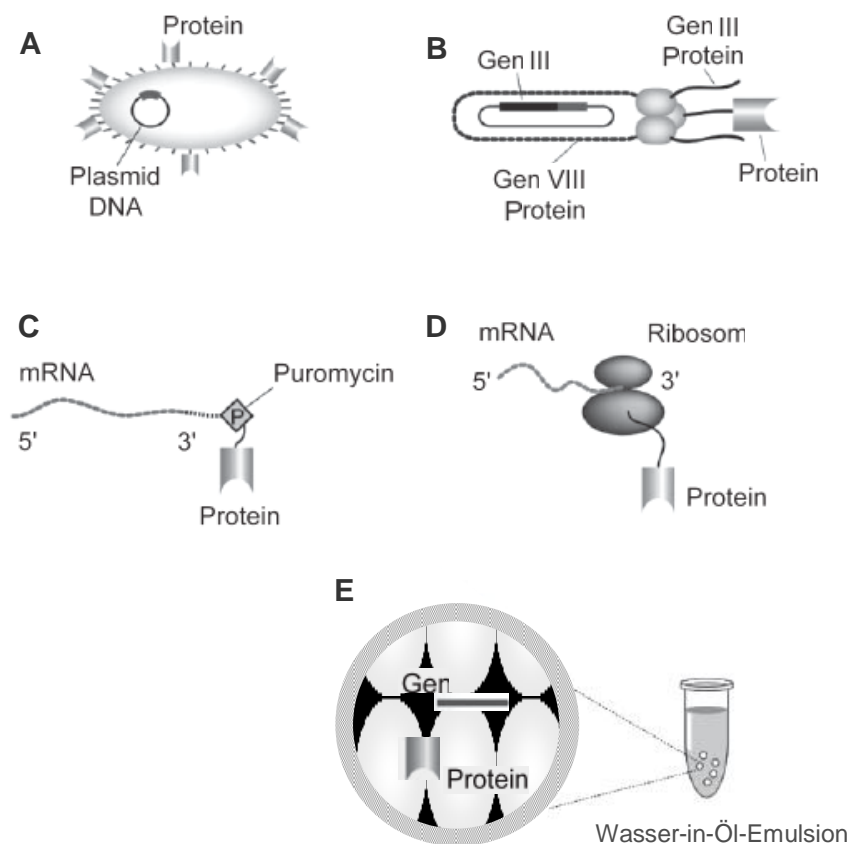


Abb. 2: Darstellung verschiedener Methoden zur Genotyp-/Phänotyp-Kopplung (verändert aus Matsuura & Yomo (2006))

Alle Systeme haben folgende gemeinsame Eigenschaften: eine für das *Protein of interest* kodierende Gensequenz; die Kopplung des Proteins mit der kodierenden Gensequenz; das *Display* des Proteins in einer für *Screening*-Anwendungen zugänglichen Form; die Möglichkeit zur leicht-handhabbaren Amplifikation selektierter Klone. (A) zellbasiertes *Display*. (B) Phagen-*Display*. (C) mRNA-*Display*. (D) Ribosomen-*Display*. (E) *in vitro* compartmentalisation.

Neben den zellbasierten entwickelten sich zellfreie *Display*-Techniken, mit denen größere Variantenanzahlen erreicht werden können, da auf die ineffiziente Transformation in Zellen verzichtet wird. Zu den *in vitro Display*-Techniken zählt das Ribosomen-*Display*, das auf der Bildung eines stabilen mRNA-Ribosom-Protein-Komplexes basiert (Mattheakis *et al.*, 1994).

Das Ribosom stagniert aufgrund eines fehlenden Stop-Kodons während der Translation und bleibt dadurch mit dem neu-synthetisierten Protein verbunden. Mit dem Ribosomen-*Display* können Bibliotheken mit bis zu 10^{12} Varianten generiert werden. Dabei müssen Reaktionsbedingungen vorliegen, bei denen der mRNA-Ribosom-Protein-Komplex intakt bleibt. Mit dieser Methode konnten unter anderem Peptide (Sawata & Taira, 2003), hochaffine Antikörper (Hanes *et al.*, 1998), und Binder im nanomolaren Bereich aus einer Ankyrin *Repeat* Protein-Bibliothek selektiert werden (Binz *et al.*, 2004).

Beim mRNA-*Display* wird das Protein kovalent über einen Puromycin-Tag an die mRNA gebunden (Roberts & Szostak, 1997). Aufgrund der kovalenten Bindung können die Selektionsbedingungen stringenter als beim Ribosomen-*Display* gewählt werden. Da Puromycin als Linker viel kleiner als ein Ribosom ist, gibt es weniger sterische Behinderungen und unspezifische Wechselwirkungen. Da die Bibliothekengröße beim mRNA-*Display* bis zu 10^{14} Varianten betragen kann, steigt die Wahrscheinlichkeit sehr seltene Sequenzen zu selektieren. So konnten mit dieser Methode hochaffine Protein-bindende Peptide (Wilson *et al.*, 2001) und ATP-Binder aus einem Pool von Zufallssequenzen identifiziert werden (Keefe & Szostak, 2001). Anwendung findet das mRNA-*Display* auch bei der Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen. Mehrere, vorher unbekannte Calmodulin-bindende Proteine konnten aus einer humanen Proteombibliothek identifiziert werden (Shen *et al.*, 2005).

Eine weitere Möglichkeit der Genotyp-Phänotyp-Kopplung stellt die räumliche Abschottung mittels *in vitro compartmentalisation* dar. Dabei imitieren Wasser-in-Öl-Emulsionstropfen die natürliche Kompartimentierung einer Zelle und enthalten neben einem Transkriptions-/Translationssystem jeweils eine Variante aus einer DNA-Bibliothek. Die Varianten werden, in Emulsionstropfen vereinzelt, in das entsprechende Protein translatiert (Tawfik & Griffiths, 1998). Für den nachfolgenden Selektionsschritt werden die Emulsionstropfen aufgebrochen. An diesem Punkt ist es wichtig, dass das Protein und dessen kodierende Sequenz assoziiert bleiben. Eine Möglichkeit dafür stellt das STABLE-*Display* dar, bei dem das biotinylierte DNA-Molekül für ein Fusionsprotein aus Streptavidin und Peptidvariante kodiert (Doi & Yanagawa, 1999). Das neu-translatierte Protein bindet mit hoher Affinität an seine kodierende, biotinylierte DNA-Sequenz. Anwendungen dieser Methode beinhalten die Selektion verbesserter FLAG-Peptide (Yonezawa *et al.*, 2003), die Anreicherung eines biologisch aktiven Proteins (Yonezawa *et al.*, 2004) und die Identifikation einer Streptavidin-Variante, die nicht nur Biotin, sondern auch das Biotin-Analogon Desthiobiotin mit gleicher Affinität bindet (Levy & Ellington, 2008).

Eine weitere Methode ist das CIS-*Display*, bei dem eine DNA-kodierte Variantenbibliothek in Fusion mit dem Initiator-Protein der DNA Replikation (RepA) vorliegt. Als cis-Element bindet RepA exklusiv an die DNA, von der es exprimiert wurde, so dass DNA-Protein-Komplexe gebildet werden (Odegrip *et al.*, 2004). *Display*-Techniken, die DNA-Protein-Komplexe verwenden, stellen im Vergleich zu Techniken mit RNA-Protein-Komplexen, aufgrund der Instabilität der RNA-Moleküle, eine zuverlässigere Methode dar.

Die beschriebenen *Display*-Techniken zur gerichteten Evolution sind in ihrer Form alle diskontinuierlich und damit in ihrer Variantenanzahl begrenzt. Bei 10^{74} Varianten, wie im Beispiel des 300 Aminosäuren großen Proteins, wäre die optimalste Variante mit hoher

Wahrscheinlichkeit nicht in der Bibliothek enthalten. Um alle potentiellen Varianten zu erfassen, wäre ein *in vitro* System von Vorteil, das die drei Schritte der Variantengenerierung (Mutation), Vervielfältigung (Replikation) und Selektion in einem Ansatz kombiniert und damit einen kontinuierlichen und Variantenanzahl-unabhängigen Prozess darstellt. In dieser Arbeit wird versucht, ein kontinuierliches *in vitro* Evolutionssystem, basierend auf den drei Prinzipien nach Darwin, zu etablieren. Ähnlich zur *in vitro compartmentalisation* soll dabei die Kopplung von Genotyp und Phänotyp aufgrund der räumlichen Nähe eines Proteins zu seiner kodierenden Sequenz stattfinden. Die Diversifizierung der Ausgangs-Sequenz soll mit einer fehlerbehafteten Nukleinsäure-Amplifikationsmethode realisiert werden.

1.3 Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden

1965 erforschten Sol Spiegelman und seine Kollegen den Mechanismus, mit dem der Bakteriophage Q β nach Infektion von *E. coli* seine Virus-RNA exponentiell amplifiziert. Dazu isolierten sie die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Replikase) aus dem Q β -Phagen (Haruna & Spiegelman, 1965) und zeigten, dass die Q β -Replikase zur hochspezifischen Replikation ihres eigenen Genoms tendiert (Spiegelman *et al.*, 1965). Diese stringente Template-Prferenz kann mit dem Anfügen von spezifischen RNA-Sekundärstruktur-Sequenzen (RQ135) zum Teil auf fremde RNA-Templates adaptiert werden (Munishkin *et al.*, 1991). Mit einer Fehlerrate von $\sim 3 \times 10^{-4}$ kann die Q β -Replikase nicht nur für die effiziente Amplifikation von RNA, sondern gleichzeitig zum Einbringen von Mutationen verwendet werden.

Beim seriellen Transfer von RNA zusammen mit der Q β -Replikase konnten RNA-Spezies beobachtet werden, die aufgrund des angelegten Selektionsdruckes, die Fähigkeit zur schnelleren Replikation erworben hatten (Mills *et al.*, 1967). So ein Evolutionsereignis konnten Bauer *et al.* (1989) in einem Kapillarexperiment erstmals visualisieren. Unter Zugabe eines RNA-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes, beobachteten die Autoren in einer Kapillare - befüllt mit Q β -Replikase, Nukleotiden und an einem Ende mit RNA - nach kurzer Inkubationszeit eine wandernde Reaktionsfront. *In vitro* Evolutionsprozesse zeigten sich dabei in einer Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit der Reaktionsfront, die auf eine schneller replizierende RNA-Generation zurückzuführen war. Weitere Bemühungen, Q β -fremde Templates mittels Q β -Replikase zu amplifizieren, scheiterten an der extrem stringenten Template-Prferenz, die zu einer langsameren Amplifikationsrate und zur Deletion der zusätzlich eingebrachten Sequenzen führte (Joyce, 2007).

Der Durchbruch der *in vitro* Evolution kam mit der Erfindung der PCR, mit der erstmals die exponentielle Amplifikation von DNA realisiert wurde (Mullis *et al.*, 1986). Anwendung findet die PCR vor allem in der Manipulation von DNA für genetische Konstruktionen, Klonierungszwecke, Sequenzierungen und in der Diagnostik. Die Kombination der PCR mit interkalierenden Farbstoffen führte zur Entwicklung der *real-time* PCR (Higuchi *et al.*, 1992), mit der die Quantifizierung der DNA-Amplifikation in Echtzeit möglich wurde.

Die Detektion und Amplifikation von RNA-Sequenzen mittels PCR (RT-PCR) erfordert einen vorangestellten Reverse Transkriptase (RT)-Schritt, bei dem die RNA in cDNA umgeschrieben wird, die dann als Template für die PCR dienen kann. Aufgrund der hohen Sensitivität konnten

mit der RT-PCR eine Vielzahl viraler Pathogene, beispielsweise das Hepatitis C-Virus aus Plasma (Kubo *et al.*, 1989) oder das HIV1-Virus in PBMCs (Zaia & Rossi, 1989), detektiert werden.

Parallel zur PCR-Technologie entwickelten sich Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden mit denen RNA-Moleküle spezifisch detektiert und isotherm amplifiziert werden können. Basierend auf dem *transcription-based amplification system* (TAS, Kwoh *et al.*, 1989) entstand zunächst das *self-sustained sequence replication system* (3SR). In diesem System ermöglicht die gemeinsame Aktivität einer Reversen Transkriptase, einer RNase H und einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase die Amplifikation des gewünschten Nukleinsäuremoleküls. Die retrovirale RNA-Replikation imitierend, entsteht ausgehend von einem RNA-Molekül mittels Reverser Transkription ein cDNA-Intermediat, das wiederum als Template für die Transkription von RNA-Molekülen fungiert. Der repetitive Zyklus aus RNA-cDNA-Molekülen ermöglicht damit eine 10^7 -fache RNA-Amplifikation nach 1 – 2 Stunden Inkubationszeit (Gingeras *et al.*, 1990; Guatelli *et al.*, 1990).

1.3.1 NASBA

Die *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) ist eine sensitive, isotherme oligonukleotid-abhängige Methode zur spezifischen Amplifikation von Nukleinsäuren (Compton, 1991; Kievits *et al.*, 1991).

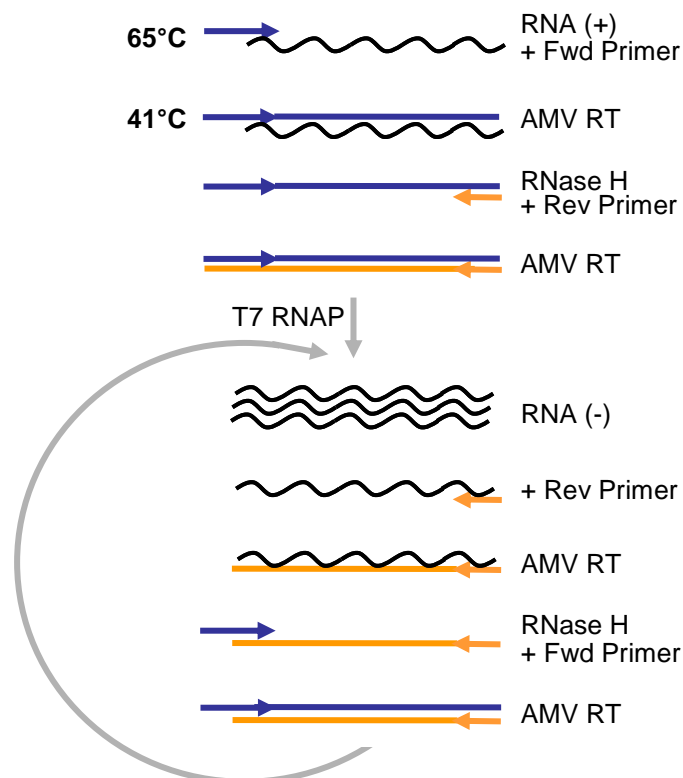


Abb. 3: Schematischer Ablauf der NASBA

Orange und blaue Linien stellen jeweils einen DNA-Einzelstrang dar, gewellte schwarze Linien stellen RNA-Moleküle dar. Blaue Pfeile stehen für den *Forward*-Primer (mit T7 Promotor-Sequenz), orange Pfeile für den *Reverse*-Primer. AMV RT: *Avian myeloblastosis virus* Reverse Transkriptase, T7 RNAP: T7 RNA Polymerase. Kodierender Strang (+), nicht-kodierender Strang (-).

Basierend auf der 3SR-Methode ermöglichen die Zugabe von DMSO und die Optimierung der Oligonukleotid-Konzentration eine spezifischere RNA-Amplifikation mit reduziertem Hintergrundsignal (Kievits *et al.*, 1991). Der Ablauf der NASBA ist schematisch in Abb. 3 dargestellt. Die „klassische“ NASBA beruht auf der gemeinsamen Aktivität der *Avian myeloblastosis virus* Reversen Transkriptase (AMV RT), der RNase H und der T7 RNA Polymerase (T7 RNAP). An das zu detektierende RNA-Molekül hybridisiert, nach einem Denaturierungsschritt bei 65°C, ein spezifischer *Forward*-Primer (Fwd Primer), der eine zur RNA komplementäre Sequenz und die T7 Promotor-Sequenz enthält. Bei 41°C wird dieser Primer durch die Aktivität der AMV RT elongiert und gleichzeitig der RNA-Anteil im entstehenden RNA/DNA-Hybrid durch die Aktivität der RNase H degradiert. Dies ermöglicht die Hybridisierung eines spezifischen *Reverse*-Primers (Rev Primer) und dessen Elongation durch die AMV RT. Das synthetisierte cDNA-Molekül besitzt einen doppelsträngigen T7 Promotor-Bereich und steht in der nun folgenden zyklischen Phase als Template für die Transkription durch die T7 RNA Polymerase zur Verfügung. An die neu-transkribierte RNA lagert sich der *Reverse*-Primer an und die AMV RT synthetisiert den Erststrang. Gleichzeitig degradiert die RNase H den RNA-Anteil im RNA/DNA-Hybrid und ermöglicht die Anlagerung des spezifischen *Forward*-Primers. Die AMV RT synthetisiert den Zweitstrang und durch den Zyklus aus cDNA-RNA-Molekülen kommt es so zu einer Amplifikation des Ausgangs-RNA-Moleküls (Deiman *et al.*, 2002).

Ein wichtiges Merkmal des NASBA *Forward*-Primers im Vergleich zu Primern, die in anderen DNA-Amplifikationsmethoden zum Einsatz kommen, ist die T7 RNA Polymerase Promotor-Sequenz. Diese hochkonservierte, 23 Nukleotide lange Konsensus-Sequenz (Dunn & Studier, 1983) befindet sich im 5'-Bereich des *Forward*-Primers. Das 3'-Ende des *Forward*-Primers enthält eine zum RNA-Molekül komplementäre Sequenz, die optimalerweise eine Länge von circa 17 – 30 Nukleotiden und einen GC-Gehalt von 45 – 60% hat. Der *Reverse*-Primer enthält eine Sequenz, die komplementär zum, zuvor mittels *Forward*-Primer, synthetisierten DNA-Molekül ist. Die optimalen Reaktionsbedingungen der NASBA sind im Kapitel 2.3.13 aufgelistet. Angewendet wird die NASBA vor allem zur Detektion viraler RNA in der klinischen Diagnostik (Heim & Schumann, 2002; Greene *et al.*, 2003; Sugiyama *et al.*, 2003; Guichón *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 2005) und zum Nachweis von Bakterien- und Pilz-RNA (Birch *et al.*, 2001; Borst *et al.*, 2002; Guichón *et al.*, 2004). In Kombination mit einer silica-basierten Extraktionsmethode kann die NASBA auch zum Nachweis von TNF-alpha mRNA in Zellkultur-Lysaten verwendet werden (Darke *et al.*, 1998). Weiterhin können bakterielle Kontaminationen in Lebensmitteln oder Umweltproben mittels NASBA, ohne zeitaufwändige Kultivierungsmethoden, effizient nachgewiesen werden (Uyttendaele *et al.*, 1995; Cook, 2003).

Da die an der NASBA beteiligten Enzyme keine *proof-reading*-Aktivität besitzen, findet eine fehlerbehaftete Amplifikation der Nukleinsäuren statt. Die Fehlerrate der T7 RNA Polymerase wird mit 6×10^{-5} pro Basenpaar (Brakmann & Grzeszik, 2001). Die Mutationsraten von Reversen Transkriptasen liegen im Bereich von 2×10^{-6} – 6×10^{-4} pro Basenpaar (Varela-Echavarría *et al.*, 1992).

1.4 *In vitro* Proteinexpression

Die Expression von Proteinen außerhalb eines lebenden Organismus wird als *in vitro* Proteinsynthese bezeichnet und findet vor allem in der strukturellen und funktionellen Proteomforschung Anwendung. Die zellfreie Proteinexpression bietet gegenüber der herkömmlichen zellbasierten Expressionsmethode unter anderem folgende Vorteile: die geringe Sensitivität gegenüber zelltoxischen Proteinen, die relativ einfache Anpassung der Reaktionsbedingungen, je nach den Anforderungen des Zielproteins, der Einbau alternativer Aminosäuren und die Eignung für Hochdurchsatz-Strategien aufgrund der reduzierten Volumina und Prozesszeiten.

Die ersten zellfreien Proteinexpressionen wurden bereits 1950 mit aufgeschlossenen Staphylokokken bzw. aus Rattenleber isolierten Fraktionen durchgeführt (Borsook, 1950; Winnick, 1950; Gale & Folkes, 1954). Eine bedeutende Weiterentwicklung der *in vitro* Translation gelang Nirenberg & Matthaei (1961) mit der Expression exogener mRNA in einem bakteriellen System. Als weiterer Meilenstein kann die Entwicklung von gekoppelten Transkriptions-/Translationssystemen gesehen werden. Dabei wurde das DNA Template *in situ* durch zugesetzte *E. coli* RNA Polymerase in mRNA transkribiert und die mRNA bereits während ihrer Synthese in Protein translatiert (Wood & Berg, 1962; Byrne *et al.*, 1964).

Mit der Entwicklung der kontinuierlichen, zellfreien Proteinsynthese-Technologie (CFCF, *continuous-flow cell-free*) konnte die Proteinexpression über einen Zeitraum von bis zu 40 Stunden aufrecht erhalten werden (Spirin *et al.*, 1988). Dabei werden dem System kontinuierlich über eine Ultrafiltrationsmembran Komponenten zugeführt, die sich im Laufe der Reaktion verbrauchen (Aminosäuren, NTPs, Komponenten des energie-regenerierenden Systems) und gleichzeitig verbrauchte Komponenten (Nukleotidmonophosphate, anorganische Phosphate) und das exprimierte Protein abgeführt.

Die Aufklärung der *E. coli* Proteinsynthese-Maschinerie hinsichtlich Struktur, Genetik, Metabolismus und Regeneration der einzelnen Komponenten und Reaktionen, ermöglichte die weitere Optimierung der *Batch*-Systeme. Durch den Einsatz von aufkonzentrierten Zellextrakten, optimierten Salzkonzentrationen und der Ergänzung von frühzeitig abgebauten Aminosäuren konnten höhere Proteinausbeuten als mit der CFCF-Technologie erreicht werden (Kim *et al.*, 1996). Mit Modifikationen basierend auf der Methode von Zubay (1973) entwickelte die Firma Roche das *Rapid translation system* (RTS) 100 *E. coli* HY, ein Proteinsynthesystem, bei dem das Lysat aus einem *E. coli* Stamm mit niedriger Exonuklease Aktivität präpariert wird. Dies ermöglicht die Expression von linearen DNA-Templates über einen längeren Zeitraum, ohne deren frühzeitigen Abbau durch Exonukleasen.

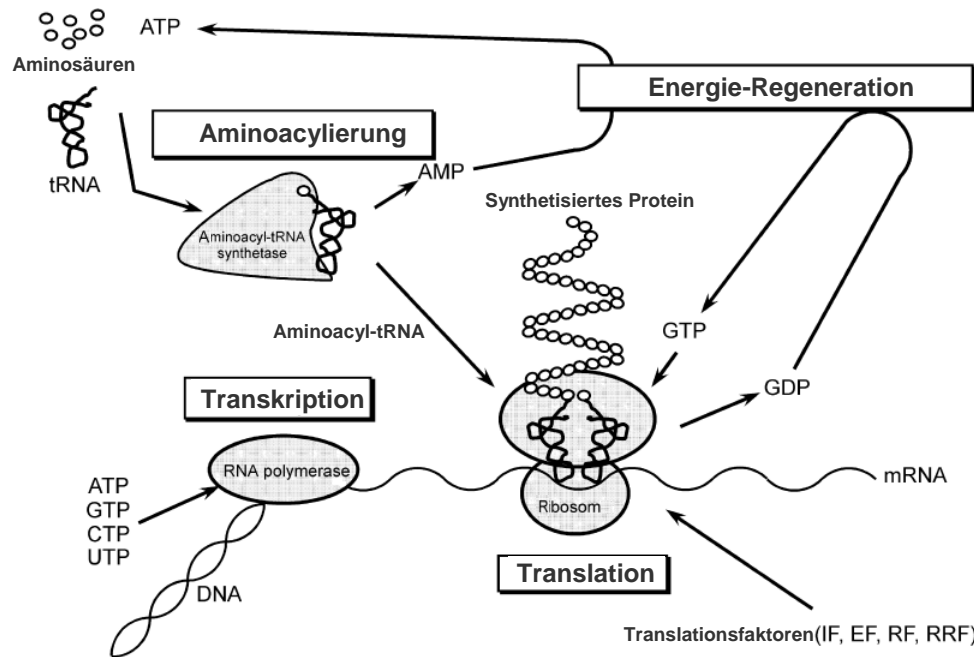


Abb. 4: Die vier Hauptreaktionen in einem *in vitro* Proteinexpressionssystem (verändert aus Shimizu *et al.* (2005))

Die vier Hauptreaktionen - Transkription, Aminoacylierung, Translation und Energie-Regeneration - sind schematisch dargestellt.

In vitro Translationssysteme wurden auch auf der Basis eukaryotischer Zellen entwickelt. So beschreiben Roberts & Paterson (1973) die *in vitro* Translation von Tabakmosaik-Virus RNA in einem aus Weizenkeimen präpariertem Expressionssystem. Die *in vitro* Translation exogener mRNA in einem Kaninchen Retikulozyten-Lysat wurde von Pelham & Jackson (1976) beschrieben. Eine Vielzahl an Proteinen kann erst durch posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung, Sulphorylierung) ihre aktive Form erhalten. Solche Modifikationsprozesse sind mit eukaryotischen Expressionssystemen möglich (Pollard *et al.*, 1990). Die Kopplung von Transkription und Translation konnte später auch in eukaryotischen Systemen realisiert werden (Resto *et al.*, 1992; Switzer & Heneine, 1995). Für die *in vitro* Expression von Proteinen mit speziellen Glykosylierungsmustern wurde ein, auf HeLa-Zellen basierendes, humanes Proteinsynthesystem entwickelt (Bergamini *et al.*, 2000).

Einen Entwicklungssprung für die *in vitro* Proteinsynthese stellt das im Jahr 2001 etablierte PURE (*Protein synthesis using recombinant elements*) System, ein rekombinantes Transkriptions-/Translationssystem, dar. Bereits 1977 wurden die für eine *in vitro* Translation benötigten *E. coli* Komponenten beschrieben (Kung *et al.*, 1977). Darauf aufbauend entwickelten Shimizu *et al.* (2001) das PURE System, ein zellfreies *in vitro* Proteinsynthesystem, das aus definierten, rekonstituierten Bestandteilen des *E. coli* Translationsapparates besteht. Wie in einem gekoppelten zellfreien Transkriptions-/Translationssystem wird das lineare DNA-Template oder die Plasmid-DNA mittels T7 RNA Polymerase in mRNA transkribiert und in Protein translatiert. An den drei Schritten der Translation (Initiation, Elongation und Termination) sind neben den Ribosomen, die Methionin-tRNA-Formyltransferase, je drei Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren, der *Ribosome Recycling Factor*, tRNAs, Aminosäuren und Aminoacyl-tRNA-Transferasen beteiligt. Ein Energie-Regenerationssystem,

NTPs, Salze und Puffer vervollständigen das System. Aufgrund der aufgereinigten Komponenten ist das PURE System im Gegensatz zu einem herkömmlichen Lysat-basierten Expressionssystem frei von kontaminierenden Exonukleasen, RNasen und Proteasen (Shimizu *et al.*, 2005). Zur korrekten Faltung und besseren Löslichkeit bestimmter Proteine können dem PURE System Chaperon-Systeme zugesetzt werden. So konnte durch die Zugabe von DnaK und GroE ein löslicher und funktioneller scFv-Antikörper exprimiert werden (Ying *et al.*, 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines kontinuierlichen, zielgerichteten Verfahrens zur Evolution hochaffiner Protein-Liganden *in vitro*. Im Gegensatz zu bisherigen Methoden der gerichteten Evolution soll mit diesem System die kontinuierliche und adaptive Modifikation von Proteinen, basierend auf den drei Prinzipien von Darwin (Mutation, Selektion, Replikation), ermöglicht werden. Ausgehend von zwei Proteinen, X und Y, die bereits eine schwache Affinität zueinander besitzen, soll die Bindungseigenschaft des Proteins Y so angepasst werden, dass es stärker mit Protein X interagiert. Das System basiert auf der Kombination von fehlerbehafteter DNA-Amplifikation, *in vitro* Translation und der Affinität zweier Bindepartner zueinander.

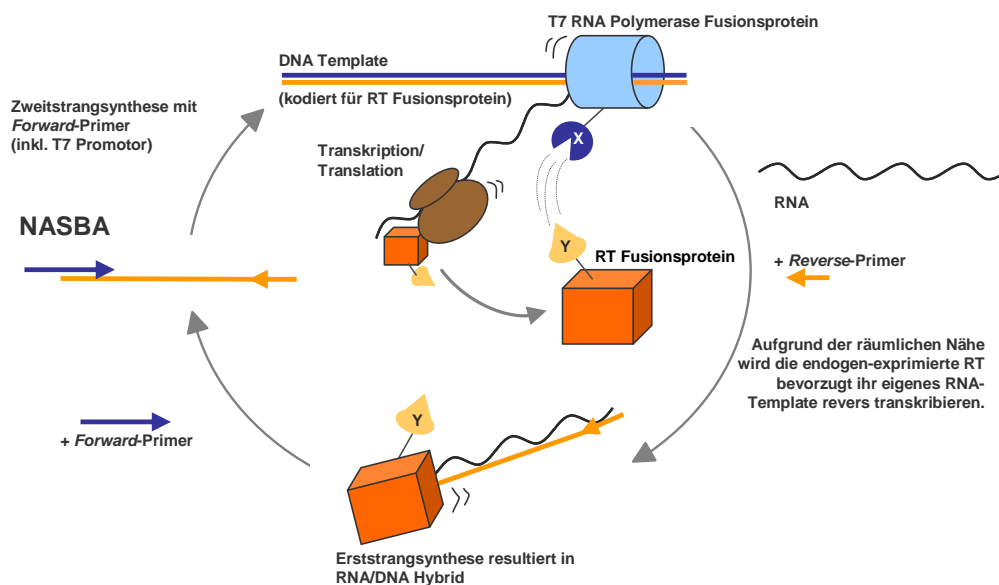


Abb. 5: Schematische Darstellung des Verfahrens zur kontinuierlichen, zielgerichteten Evolution hochaffiner Protein-Liganden *in vitro*

Details siehe Text. RT: Reverse Transkriptase, X & Y: Interaktionspartner, wobei X den konstanten und Y den zu evolvierenden Bindepartner darstellt.

Ausgehend von einem DNA-Template, das für ein Fusionsprotein aus Reverser Transkriptase und zu evolvierendem Bindepartner Y kodiert, findet eine *in vitro* Proteinsynthese statt. Dabei erfolgt die Transkription durch die T7 RNA Polymerase, die als Fusion mit dem konstanten Bindepartner X im System vorliegt. Die entstandene mRNA wird in ein Reverse Transkriptase-Fusionsprotein translatiert. Je nach Affinität der beiden Bindepartner zueinander, gelangt die endogen exprimierte Reverse Transkriptase in die räumliche Nähe ihres mRNA-Templates und

revers transkribiert dadurch ihre eigene mRNA statistisch bevorzugt. Wie bereits für die NASBA beschrieben, findet über ein RNA/DNA-Intermediat die Reverse Transkription von cDNA-Molekülen statt, die im 5'-Bereich die T7 Promotor-Sequenz kodieren. Die neu-synthetisierten cDNA-Moleküle können von der T7 RNA Polymerase erneut in eine Vielzahl von mRNA-Molekülen transkribiert werden. Aufgrund der gemeinsamen Aktivität von T7 RNA Polymerase und Reverser Transkriptase ist eine fehlerbehaftete DNA-Amplifikation unter isothermen Bedingungen möglich. Höher affine Bindepartner reichern sich im System an, da sie, aufgrund der in räumlicher Nähe befindlichen Reversen Transkriptase, verhältnismäßig öfter repliziert werden. Die Selektion soll mit einem Kapillarsystem, ähnlich dem von Bauer *et al.* (1989), realisiert werden. Dabei basiert das Selektionsprinzip darauf, dass ein schneller replizierender Bindepartner in Form einer Replikationsfront entlang der Kapillare hin zu unverbrauchten Substraten wandert und am Ende der Kapillare geerntet werden kann. Alternativ kann die Selektion, wie von Mills *et al.* (1967) erstmalig beschrieben, nach dem Prinzip des seriellen Transfers stattfinden. Dabei werden Aliquots der Reaktionslösung zu bestimmten Zeitpunkten in Reaktionsgefäße mit unverbrauchten Reaktionskomponenten transferiert. Nur die Variante mit ausreichend hoher Replikationsrate besitzt die Möglichkeit zur Anreicherung im System. Mit der Etablierung so eines Systems, wäre die Variantenanzahl-unabhängige Evolution in Form eines kontinuierlichen Prozesses durchführbar.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

96-well Aufreinigungsplatte MultiScreen PCR μ 96	Millipore
96-well MaxiSorp-Platte	Nunc
Combitips plus (0,1 mL, 1 mL, 5 mL), steril	Eppendorf
Einmal-Impfösen, 0,1 μ L	Carl Roth
Elektroporationsküvetten, 1 mm, Gene Pulser	Bio-Rad
Filterpapier, 2,5 μ m	Whatman
Mikro-Schraubröhre, 2 mL	Sarstedt
Mikrotiter-Platten	Nunc
Nitrocellulose-Membran Protran BA 85, 0,45 μ m	Whatman
PCR-Reaktionsgefäße	Anthos Mikrosysteme
PCR-Platte 96-well Multiply	Sarstedt
PCR-Folie Adhesive	ABgene
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, 5 mL)	Sarstedt, Kisker, Eppendorf
Polypropylen-Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Anthos Mikrosysteme
Reaktionsgefäße und Deckel für real-time PCR	Bio-Rad
Serologische Pipetten (10 mL, 25 mL)	Carl Roth
Sterilfilter (0,22 μ m, 0,45 μ m)	Carl Roth
UV-Küvetten	Eppendorf

2.1.2 Laborausstattung

96-well Platten-Auswerter	infinite M200	Tecan
Autoklaven	Systec V-150	Systec
Chemolumineszenz Imager	Chemocam HR 16	Intas
Elektrophorese-Apparaturen	Mini-Subcell GT (DNA)	Bio-Rad
	Sub-Cell Modell 192 (DNA)	Bio-Rad
	Minigel Twin (SDS)	Biometra
	Minigel Twin (SDS)	Biometra
Elektrophorese-Netzgeräte	PowerPac TM Basic	Bio-Rad
	PowerPac 300	Bio-Rad
	Standard Power Pack P25	Biometra
	Consort E815	Consort
Elektroporatoren	MicroPulser TM	Bio-Rad
FPLC-Anlagen	ÄKTApurifier	GE Healthcare
Geldokumentationsanlage	Gel ix Imager	Intas
Heizblöcke	Thermomixer comfort	Eppendorf
Inkubatoren	Multitron HT	Infors AG
	Brutschrank	Heraeus
Magnet	Dynal MPC-S	Invitrogen
Magnetrührer	MR Hei-Mix L	Heidolph

Mehrfachpipette	AutoRep E Rainin	Mettler Toledo
Mehrkanalpipetten	Transferpette-12 (5-50 µL, 20-200 µL)	Brand
Mixer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Orbitalschüttler	KM-2	Edmund Bühler
PCR-Cycler	iCycler	Bio-Rad
	Tprofessional	Biometra
real-time Cycler	Mini Opticon	Bio-Rad
Reinst-Wasser-Anlage	membraPure	Astacus
pH-Meter	Lab850	Schott Instruments
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten	Research (20 µL, 200 µL, 1000 µL, 5 mL)	Eppendorf
Rosettenzelle	RZ 1	Bandelin electronic
Sequenziergerät	3710xl DNA Analyzer	Applied Biosystems
Sterilbank	CA REV4	Clean Air
Überkopfschüttler	Roto-Shake Genie	Scientific Industries
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD2070	Bandelin electronic
Waagen	Analysenwaage SI-203	Denver Instrument
Western Blot-Apparaturen	EBX-700	C.B.S. Scientific
Zentrifugen	5810R, 5424, 5417R	Eppendorf
	Microzentrifuge	Carl Roth
	Speed-Vac Concentrator 5301	Eppendorf

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Fluka/Sigma-Aldrich (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim) und Roche (Mannheim) bezogen.

30% Acrylamidmix (37:1)	Carl Roth
40% Acrylamidmix (19:1)	Carl Roth
Agarose	Serva
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth
Betain	Fluka
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BM Chemiluminescence Blotting Substrate	Roche
Bromphenolblau	Merck
Deoxynucleotide Solution Mix (10 mM, 25 mM)	NEB
DEPC-H ₂ O	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Finnzymes
Ethidiumbromidlösung 10 mg/mL	Carl Roth
Guanosin	Sigma-Aldrich
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth
Magnesiumacetat	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Finnzymes
Proteaseinhibitoren	Sigma-Aldrich
Ribonucleotide Solution Mix (80 mM)	NEB
RNA Loading Dye (2 x)	Fermentas
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
TMB Liquid Substrate System for ELISA	Sigma

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die Bestandteile aller Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Reinst-Wasser (membraPure, Astacus) gelöst und gegebenenfalls durch Autoklavieren bzw. Filtration sterilisiert.

Agarosegel	1,0% (w/v)	Agarose in TBE-Puffer
AP-Färbepuffer	100 mM (w/v)	Tris-HCl (pH 9,5)
	100 mM (w/v)	NaCl
	5 mM (w/v)	MgCl ₂
BCIP-Lösung	50% (w/v)	BCIP in Dimethylformamid
Bindepuffer (2 x)	10 mM (w/v)	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM (w/v)	EDTA
	2 M (w/v)	NaCl
Coomassie-Färbelösung	45% (v/v)	Ethanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	0,25% (w/v)	Brillant Blau R 250
DNA-Ladepuffer (10 x)	49,5 mM (w/v)	Tris-HCl (pH 7,6)
	51,6% (v/v)	Glycerin
	25% (w/v)	Bromphenolblau
	25% (w/v)	Xylencyanol
optional:	0,5% (v/v)	RNase A
EB-Puffer	10 mM (w/v)	Tris-HCl (pH 8,5)
Elutionspuffer (IMAC)	500 mM (w/v)	Imidazol in Waschpuffer (IMAC)
Entfärbelösung	26% (v/v)	Ethanol
	7% (v/v)	Essigsäure
Lyse-Puffer		1 x PBS
	10 mM (w/v)	Imidazol
	0,1% (v/v)	Triton X 100
	0,8% (v/v)	Proteaseinhibitoren
	0,02% (v/v)	Benzonase
MgCl ₂ -CaCl ₂ -Lösung	80 mM (w/v)	MgCl ₂
	20 mM (w/v)	CaCl ₂
MPBST	3,0% (w/v)	Milchpulver in PBST
MTBST	3,0% (w/v)	Milchpulver in TBST
Neutralisierungspuffer	0,5 M (w/v)	Tris-HCl (pH 7,0)
	1,5 M (w/v)	NaCl

NBT-Lösung	50% (w/v)	NBT in Dimethylformamid
PBS (pH 7,4)	0,8% (w/v)	NaCl
	0,02% (w/v)	KCl
	0,144% (w/v)	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,024% (w/v)	KH ₂ PO ₄
PBST	0,1% (v/v)	Tween20 in 1 x PBS
PURE-Puffer	50 mM (w/v)	HEPES KOH (pH 7,6)
	100 mM (w/v)	KGlu
	13 mM (w/v)	MgAc ₂
	1 mM (w/v)	DTT
Sammelgel-Puffer	1,0 M (w/v)	Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Laufpuffer	25 mM (w/v)	Tris
	192 mM (w/v)	Glycin
	0,1% (v/v)	SDS
SDS-Probenpuffer	2,0% (w/v)	SDS
	10% (v/v)	Glycerin
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau
	13,3 mM (w/v)	DTT
SSPE (10 x)	1,8 M (w/v)	NaCl
	100 mM (v/v)	NaPO ₄ (pH 7,7)
	10 mM (v/v)	EDTA
T7 RNAP-Lagerpuffer (2 x)	20 mM (w/v)	Tris-HCl (pH 8,0)
	200 mM (w/v)	NaCl
	0,2% (v/v)	Triton X100
TBE-Puffer (10 x)	890 mM (w/v)	Tris
	890 mM (w/v)	Borsäure
	25 mM (w/v)	EDTA
TBS-Puffer (10 x)	248 mM (w/v)	Tris
	27 mM (w/v)	KCl
	1,37 M (w/v)	NaCl
TBST	0,1% (v/v)	Tween20 in 1 x TBS
Trenngel-Puffer	1,5 M (w/v)	Tris-HCl (pH 8,8)
Waschpuffer (IMAC)	10 mM (w/v)	Imidazol
	0,1% (v/v)	Triton X100 in 1 x PBS
Western Blot-Transferpuffer	20% (v/v)	Methanol in SDS-Laufpuffer

2.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli **BL21** (Stratagene)

E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal

Escherichia coli **BL21 (DE3)** (Stratagene)

E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)

Escherichia coli **XL10-Gold** (Stratagene)

Tet^rΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte
[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]

2.1.6 Medien zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium (pH 7,0)	1,0% (w/v)	Trypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5% (w/v)	NaCl
	0,5% (w/v)	Glucose
optional:		
SOC-Medium	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	2,0% (w/v)	Trypton
	0,05% (w/v)	NaCl
	10 mM (w/v)	MgCl ₂
	20 mM (v/v)	Glucose
Agar-Festmedium	1,5% (w/v)	Agar in Flüssigmedium

2.1.7 Plasmide

Bezeichnung	Hersteller
pCR-Script (pSc)	Stratagene
pEG-His1	Mobitec
pJH-Yes1mut	Benedikt Asbach (Uniklinikum Regensburg)
pJH-Yes1wt	
pRL-TK	Promega
TOPO-Sam68	Benedikt Asbach (Uniklinikum Regensburg)

2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion bestellt.

Nr.	Bezeichnung	5' – 3'-Sequenz
1	Std_fwd	gcctcttcgctattacgccag
2	Std_rev	ttaggcaccccaggctttac
6	MM_Renilla_rev	gagtgccggccgcttagaattctgttcattttgagaactcgctc
43	MM_Renilla2_fwd	cgaggtcgacttaactttaagaagg
44	MB_Renilla	FAM -ccaagctgaagtcgctgccaacgcttg- BHQ
99	Ser139plusNheI_rev	gcaggctagcgctcgccgcgctcg
146	pEG-His1 5' primer_fwd	catcataacggttctggc
147	pEG-His1 3' primer_rev	ccgggagctgcatgtgtcagagg
270	42 bp_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccggggccccccctc gaggtcgactaac

Nr.	Bezeichnung	5' – 3'-Sequenz
281	T7RNAP_STOP_NotI_rev	gcaggcggccgcttatcatgcaaacgcaaatcgctttcc
316	pIVEX-GFP_rev	gccgccagtgtgctgg
350	StrepCore_NHis_Ndel	gcagcatatgatgcatcatcatcaccatcatcaccatcatcacggcagcgaagcgg gtattaccggcac
403	36 bp_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccggggccccccctc gaggtcga
406	30 bp_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccggggccccccctc ga
408	24 bp_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccggggcccccc
410	18 bp_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccgg
413	12 bp_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattggg
416	06 bp_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcga
441	NASBA_18_fwd	gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccgg
442	MMRT_PstI_rev	gcagctgcagaggaaacagctatgaccatgattacg
510	NASBA_pIVEX_T7Prom_ 20bp_fwd	gcagaagctttaatacgaactcactatagggagaccacaacggtttcctc
634	Biotin-NASBA_18_fwd	Biotin-gcagaagcttcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccgg
635	Biotin-MMRT_PstI_rev	Biotin-gcagctgcagaggaaacagctatgaccatgattacg
799	MMuLV_500_fwd	ctgctgtctgtgtctg
800	MMuLV_1303_fwd	gagctgtttgtggatg
804	pEVT7_MCS_fwd	gtacatatgcatcatcatcaccatcatctggtccgcgtggatccggtaccggccccatg gggtgagctcaat
805	Sam68_KpnI_fwd	tccggtaccatgcagcgccgggacgac
806	Sam68_SacI_rev	attgagctcgtatgctccctcactg
811	Yes1_EcoRI_fwd	gcaggaattcaccatctttgtcgccc
812	Yes1_EcoRI_rev	ctgcgaattcatctgctggtgcaacatag
887	ÜberNASBA_18bp_fwd	gctgtatgcctgcagaagctt
888	ÜberMMRT_PstI_rev	gctcacatgcagctgcag
906	NASBA_441plus5_fwd	gcagaagcttacgtccgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccgg
907	ÜberNASBA_441plus5_fwd	gctgtatgcctgcagaagcttacgtc
908	NASBA_442plus5_rev	gcagctgcaggatcgaggaaacagctatgaccatgattacg
909	ÜberNASBA_442plus5_rev	gctcacatgcagctgcaggatcg
910	NASBA_XhoI_09_rev	gcagctcgaggatcgaggaaacagctatgaccatgattacg
911	ÜberNASBA_XhoI_09_rev	gctcacatgcagctcgaggatcg
947	FLAG_weg_fwd	gacgggtaccatggaattcgaaggcggcggtagcg
948	MMuLV_StrepTagII_Sac_rev	gcaggagctcttattatcttcaaacctgcggatggctccaattagtttcggtaattgctgctt tacg
949	NASBA_FLAG_MMuLV2_rev	gcagttattactgtcatcgtcgtcctttagtcagtttcggtaattgctgctttacg
1006	907_ÜBEREcoRI_fwd	gactgaattccctgcagcatatgacgtc
1007	911_ÜBERClaI_rev	gactatcgatcgaggctagcgatcg
1030	HN.NdeKpn_fwd	atgccatatgcataaccataaccataatcacaaccataatcatggtaccggtaccat gc
1031	HN.NdeKpn_revcom	gcatggtaccggtaccatgattatggttgattatggttatggttatgcatatggcat
1033	HAT.NdeKpn_fwd	atgccatatgaaagatcatctgattcacaacgtgcataacgaacatgcgcacgcgc ataacaaagggtaccatgc
1034	HAT.NdeKpn_revcom	gcatggtacctttgttatgcgcgtgcgcgtgttcgttatgcacgttgtaatcagatgatct ttcatatggcat
1131	MMuLV_580_rev	cttgtggcagacgagtc

Nr.	Bezeichnung	5' – 3'-Sequenz
1138	pEV-P5insert_fwd	gcaggggtaccgcgggcattcagcgcattccgttaccgccgcccgcggcgccggaa acctatgaagaatatgagctcgag
1139	pEV-P5insert_rev	ctgcgagctcatattctcataggtttccggcgccggcgggcggtaacggaatgc gctgaatgcccgcgtaccctgc
1140	pEV-P1insert_fwd	gcaggggtaccgcgagcccggcgacccagccgcccgtgctgcccgcgagcg cgaccggcccggatgagctcgag
1141	pEV-P1insert_rev	ctgcgagctcatccgggcccggctcgctcgggcgagcagcgggcgggctgggt cgccgggctcgcggtaccctgc
1276	Strep-MMuLV_fwd	gcagccatggactggagccatccgcagtttgaaaaactgggatccgaaggcgg
1286	StrepTag_fwd	gactggagccatccgcag
1287	FlagTag_fwd	ggactacaaggacgacg
1354	Yes1WT_fwd	atgaagcccgtaccaccgaa
1355	Yes1MUT_fwd	atagttctcagtatggtccg

2.1.9 Größenstandards für die Elektrophorese

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung	Größenbereich
2log DNA Ladder	NEB	DNA-Agarosegel	100 – 10.000 bp
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas	SDS-PAGE	11 – 170 kDa
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas	SDS-PAGE	10 – 250 kDa
RiboRuler™ RNA Ladder, Low Range	Fermentas	Southern Blot	100 – 1000 Basen

2.1.10 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Avian myeloblastosis virus</i> Reverse Transkriptase (26.600 U/mL)	Seikagaku
Calf intestinal alkaline phosphatase (10.000 U/mL)	NEB
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	NEB
Human immunodeficiency virus Reverse Transkriptase (10.000 U/mL)	Ambion
Klenow Fragment (3' → 5' exo-) (5000 U/mL)	NEB
<i>Moloney murine leukaemia virus</i> Reverse Transkriptase (200.000 U/mL)	NEB
<i>Moloney murine leukaemia virus</i> Reverse Transkriptase RNase H- (200.000 U/mL)	Promega
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2000 U/mL)	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNase A (10 mg/mL)	Fermentas
RNase H (5000 U/mL)	NEB
Single strand binding protein (2 mg/mL)	NEB
T4 DNA Ligase (400.000 U/mL)	NEB
T4 Gene 32 Protein (10 mg/mL)	NEB
T7 RNA Polymerase (50.000 U/mL)	NEB
Yeast inorganic pyrophosphatase (100 U/mL)	NEB

2.1.11 Antikörper, Antikörperkonjugate und Antikörperseren

Antikörper	Verdünnung für Immunfärbung	Hersteller
Kaninchen anti-HN-Tag polyklonal	1:5000	Clontech
Maus anti-FLAG M2 IgG	1:500	Sigma
Maus anti-T7 RNA Polymerase IgG	1:10.000	Novagen
Maus anti-Renilla IgG	1:10.000	Millipore
Antikörperkonjugate		
Streptavidin-AP	1:10.000	Sigma
Strep-Tactin-HRP	1:8000	IBA
Ziege anti-Maus IgG-HRP	1:5000	Sigma
Ziege anti-Kaninchen-IgG-HRP	1:5000	Pierce
Antikörperseren		
Kaninchen anti-DNA Pol I polyklonal	1:500	Davids Biotechnologie
Kaninchen anti-MMuLV RT polyklonal	1:5000	Davids Biotechnologie
Kaninchen anti-T7 RNA Polymerase polyklonal	1:5000	Davids Biotechnologie

2.1.12 Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
PCR Master Mix	Promega
PURE System, PURE Δ T7 RNA Polymerase System	PGI, NEB
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RTS 100 <i>E. coli</i> HY Kit	Roche
Rabbit Reticulocyte Lysate/Wheat Germ Extract Combination System	Promega
RetroSys C-type Reverse Transcriptase Activity Kit	Innovagen
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen

2.1.13 Säulenmaterial und magnetische Partikel

Bezeichnung	Hersteller
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen
Gelfiltrationssäule, TSKgel G4000PWxl	Tosoh Bioscience
HisTALON™ Cartridge	Clontech
HiTrap™ Desalting Column	GE Healthcare
TALON Metal Affinity Material	Clontech

2.1.14 Computerprogramme

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Chromas 2.31	Darstellung von Sequenzierdaten	Technelysium Pty Ltd
MJ Opticon Monitor Analysis Software Version 3.1	Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der real-time Cyclex-Messungen	Bio-Rad
MS Office XP	Erstellen von Abb., Dokumenten	Microsoft Corporation
Scion Image	Auswertung Agarosegel-/Western Blot-Abbildungen	Scion Corporation
SeqMan Pro	DNA-Sequenzanalyse	DNASTAR
VectorNTI Advance™ 10	Erstellung von Vektorkarten	Invitrogen

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Lagerung von *Escherichia coli*-Kulturen

Bei kurzzeitiger Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden Ausstriche auf Agar-Festmedien bei 4°C für maximal vier Wochen gelagert. Nach Ablauf dieses Zeitraums wurden entweder neue Ausstriche erstellt oder es wurde auf Glycerin-Stocks zurückgegriffen. Dafür wurden Übernachtskulturen mit 20% sterilem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst eine 10 mL Vorkultur in LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 50 mL LB-Medium mit 0,5 mL der Vorkultur beimpft und bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6 - 0,8$ geschüttelt. Die Kultur wurde in ein steriles Röhrchen umgefüllt und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 15 mL eiskalter $MgCl_2$ - $CaCl_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 2 mL eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen. Die Zellen konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder aliquotiert bei -80°C gelagert werden.

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 750 mL LB-Glucose-Medium mit 1/100 Volumen der Vorkultur angeimpft und bei 220 rpm und 37°C bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ geschüttelt. Die Zellen wurden in sterile Röhrchen überführt und 30 min auf Eis gelagert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 2600 x g wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 400 mL und anschließend mit 100 mL Milli-Q-Wasser gewaschen. Danach wurde das Pellet in 10 mL 10%igem Glycerin vorsichtig resuspendiert und erneut 15 min zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 4 mL 10%igem Glycerin gelöst, in 100 µL-Aliquots mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 µL Zellen mit 1 – 20 µL DNA (50 – 200 ng) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 42°C für 45 sec einem Hitzeschock unterzogen und für 2 min auf Eis inkubiert. Den Zellen wurde anschließend 300 µL vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und der Ansatz bei 37°C und 550 rpm für 1 h im Thermomixer geschüttelt.

Für die Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 50 µL Zellen mit 1 – 10 µL DNA (50 – 200 ng) auf Eis gemischt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette gefüllt. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 1,8 kV und einer Pulsdauer von 4 – 5,4 Millisekunden durchgeführt. Anschließend wurden 400 µL auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben, die Suspension in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C und 500 rpm im Thermomixer geschüttelt.

Die transformierten Zellen wurden auf LB-Festmedien mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele (1 – 3% (w/v) Agarose in TBE-Puffer) hergestellt und mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden zusammen mit einem Größenstandard bei einer Spannung von 80 – 100 V für 30 – 40 min aufgetrennt. Die Visualisierung mittels UV-Licht und die Aufnahme der Agarosegele wurden an der Geldokumentationsanlage der Firma Intas durchgeführt.

2.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Lösung oder aus einem Agarosegel wurde mit dem *MinElute PCR Purification Kit* bzw. mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) laut Angaben des Herstellers durchgeführt.

Weiterhin wurden DNA-Fragmente, speziell biotinylierte DNA-Fragmente, mit an magnetischen Partikeln immobilisiertem Streptavidin (Dynabeads M-280, Invitrogen) aufgereinigt. Dazu wurden 10 µL magnetische Partikel zweimal mit 200 µL H₂O gewaschen, dabei die Partikel mit einem Dynal MPC-S Magneten (Invitrogen) zurückgehalten, und dann in 10 µL 2 x Bindepuffer aufgenommen. Es wurden 10 µL Probe dazugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifisch an die magnetischen Partikel gebundene DNA-Fragmente wurden durch zweimaliges Waschen mit 200 µL H₂O entfernt und die magnetischen Partikel in 10 µL H₂O aufgenommen.

2.3.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Verwendet wurden pro Präparation je 3 mL einer steril angelegten Übernacht-Kultur. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 µL EB-Puffer. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.4 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Für die photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen und Reinheit wurde die Absorption einer DNA-Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Eine Absorption von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL (Sambrook & Russell, 2001). Reine DNA besitzt einen Quotient $A_{260}/A_{280} \sim 1,8 - 2,0$.

2.3.5 Aufkonzentrierung von DNA

Zur Aufkonzentrierung von DNA wurde diese in einer Speed-Vac (Eppendorf) bei 45°C für 5 – 20 min auf eine Konzentration von etwa 200 ng/µL eingedampft.

2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Moleküle exponentiell vervielfältigt werden (Mullis *et al.*, 1986). Außerdem ermöglicht die PCR bei der Verwendung entsprechender Oligonukleotide (Primer) den Einbau von Enzym-Erkennungssequenzen an den Enden des PCR-Produkts.

Zur Amplifikation eines DNA-Fragmentes wurde standardmäßig eine PCR mit der *Phusion™ High-Fidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes) durchgeführt. Für eine Kolonie-PCR wurde der *PCR Master Mix* (Promega), der eine *Taq*-Polymerase enthält, verwendet.

Ansatz Standard-PCR			Ansatz Kolonie-PCR	
1 x Phusion HF-Puffer			1 x PCR Master Mix	
0,2 mM dNTPs			0,5 µM je Primer	
1 µM je Primer				
0,016 U/µL Phusion Polymerase				
0,1 – 1 ng/µL Template-DNA (10 – 100 ng)				
3% DMSO (optional)				

Standard-PCR		Zyklen	Kolonie-PCR	
Zeit	Temperatur		Zeit	Temperatur
2 min	98°C	1	5 min	95°C
20 sec	98°C	30	30 sec	95°C
30 sec	50 – 70°C		30 sec	50 – 70°C
30 – 120 sec	72°C		30 – 210 sec	72°C
10 min	72°C	1	10 min	72°C

Die Temperatur bei der Primerhybridisierung wurde abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt des Oligonukleotids gewählt. Die Elongationszeit ergab sich aus der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes und der Synthese-Geschwindigkeit der verwendeten DNA-Polymerase.

Als weitere Anwendung der PCR wurde in dieser Arbeit eine sogenannte Über-PCR durchgeführt. Die Über-Primer binden, wie bei einer Standard-PCR, spezifisch an die Enden eines DNA-Templates. Der Unterschied besteht darin, dass die Hybridisierungsbereiche zuvor mit NASBA-Primern während der NASBA in das DNA-Template eingebracht wurden. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zwischen NASBA-Produkt und Ausgangs-Template. Eine Über-PCR wurde mit 3% DMSO angesetzt und mit dem Standard-PCR-Programm mit 35 Zyklen durchgeführt.

2.3.7 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA-Molekülen wurde mit Typ II-Restriktionsendonukleasen (NEB), mit den Puffern und nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsansätze hatten üblicherweise ein Volumen von 20 – 50 µL und wurden für 1 – 4 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.3.8 Dephosphorylierung von DNA

Um die Rezirkularisierung von Plasmiden (Re-Ligation) während der Ligation zu minimieren wurden die 5'-Phosphate hydrolysiert. Dazu wurden die Plasmide nach einem Verdau mit 1 μL *calf intestinal phosphatase* (CIP) für 60 min bei 37°C inkubiert.

2.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von zwei DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden beinhaltet die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe des einen und einer freien 3'-Hydroxylgruppe des anderen Fragments. Für die Ligation eines DNA-Fragments (Insert) in ein Plasmid wurden 10 μL Ansätze mit 10 – 50 ng Plasmid und einem 5-fachen Überschuss molarer Enden des Inserts mit 1 μL T4 DNA Ligase (NEB) für 2 – 3 h bei 18°C inkubiert.

$$\frac{c_{\text{DNA}} (\mu\text{g/mL})}{[(\text{Anzahl Bp}) \times (660 \text{ Da/Bp})]} \times 2 = \text{Anzahl molarer Enden (ME)}$$

2.3.10 DNA Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde im Haus nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt.

2.3.11 Generierung eines NASBA-Templates

Das Template für die NASBA muss neben dem T7 Promotor, einen kodierenden Bereich und die komplementären Sequenzen zur Hybridisierung der NASBA Primer enthalten. Zur Generierung des Templates wurde das gewünschte Gen über die Restriktionsschnittstellen KpnI/SacI in das Vektorgerüst pPCR-Script (kurz: pSc, siehe Anhang) kloniert. Mittels PCR mit den *upstream* bzw. *downstream* hybridisierenden Standard-Primern wurde das Template (inklusive T7 Promotor und NASBA Primer-Hybridisierungsbereichen) aus dem Vektor pSc amplifiziert, aufgereinigt und auf eine Konzentration von 100 ng/ μL eingestellt. Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Templates befindet sich im Anhang.

2.3.12 In vitro Transkription

Die *in vitro* Transkription ermöglicht, ausgehend von einem DNA-Template mit einem T7 Promotor, die Synthese von RNA-Molekülen und wurde laut Schenborn & Mierendorf (1985) durchgeführt.

1 x RNA Pol Reaction Puffer (NEB)
 5 mM NTPs
 5 mM MgCl_2
 25 ng/ μL DNA-Template
 1,875 U/ μL T7 RNA Polymerase (NEB)

Als weitere Anwendung wurde die *in vitro* Transkription als Aktivitätstest für die aufgereinigten T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine angewendet. Dazu wurden 4 μM *Molecular Beacon* (Nr.

44, siehe Kapitel 2.1.8) zu einer *in vitro* Transkription hinzugegeben und im *real-time Cycler* (Bio-Rad) für 99 Zyklen à 1 min und 37°C inkubiert. Die Zunahme der Fluoreszenz diente als Maß für die Aktivität und wurde mit dem Kontrollansatz mit der T7 RNA Polymerase (NEB) verglichen.

2.3.13 NASBA

Mit der NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*) können Nukleinsäuren unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide isotherm amplifiziert werden. Eine NASBA Reaktion wurde nach dem Protokoll von Romano *et al.* (1997) angesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Für die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung wurde ein RNase A-haltiger Ladepuffer verwendet.

10% DMSO
 40 mM Tris-HCl (pH 8,3)
 12 mM MgCl₂
 70 mM KCl
 5 mM DTT
 1 mM je dNTP
 2 mM je NTP
 0,2 µM je Primer
 5 ng/µL DNA-Template
 1,6 U/µL T7 RNAP
 0,325 U/µL MMuLV RT
 0,105 µg/µL BSA

2.3.14 Denaturierende PAGE

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Aufreinigung einzelsträngiger Nukleinsäuren. Die Verwendung eines denaturierenden Agens (Harnstoff, Formamid) unterdrückt die Bildung von Sekundärstrukturen, so dass das Migrationsverhalten der Moleküle unabhängig von ihrer Zusammensetzung und Sequenz nur noch abhängig von ihrer Nukleotidanzahl ist.

Komponente	3%ige Lösung	8%ige Lösung
Harnstoff	7 M	7 M
TBE	1 x	1 x
Acrylamid Mix (19:1)	3%	8%
APS	0,075%	0,075%
TEMED	0,1%	0,1%
Glycerin	0%	10,75%

Mit einer Pipette wurde zuerst die 3%ige Lösung, dann die 8%ige Lösung aufgesaugt, zwei Luftblasen zur Durchmischung nachgesaugt und der Inhalt zwischen zwei Glasplatten mit einem 1 mm Abstandshalter gegossen. Das polymerisierte Gel wurde mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer für 30 min bei 200 V/20 mA vorelektrophoretisiert. Vor dem Beladen des Gels wurden die Taschen mit 1 x TBE-Puffer ausgespült, damit der Harnstoff das Einlaufen der Proben in das Gel nicht behindert. Eine 2 µL Probe wurde mit 7,5 µL RNA *Loading Dye* (2 x)

und 5,5 μ L Formamid versetzt, für 10 min bei 95°C denaturiert und sofort aufgetragen. Das Gel wurde für circa 1 h bei 200 V/20 mA laufen gelassen.

2.3.15 Southern Blot

Der Southern Blot dient normalerweise dem spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren mittels markierter Sonden. In der vorliegenden Arbeit wird der Southern Blot angewendet um biotinyliertes NASBA-Produkt mittels Streptavidin-Konjugat spezifisch nachzuweisen. Dazu wurde das NASBA-Produkt mittels Denaturierender PAGE entsprechend der Länge aufgetrennt. Das Gel wurde 30 min in Neutralisierungspuffer (siehe Kapitel 2.1.4) neutralisiert und für weitere 30 min in Hochsalzpuffer (10 x SSPE) äquilibriert. Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels Kapillar-Blot im Hochsalzpuffer (10 x SSPE) über Nacht. Zum Fixieren der Nukleinsäuren wurde die Membran am nächsten Tag für 2 min mit UV-Licht bestrahlt.

Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 1,5% BSA-Lösung (biotinfrei) geschwenkt um unspezifische Bindungen zu blocken. Dann wurde die Membran mit dem Streptavidin-AP-Konjugat für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 4 x 5 min in TBST gewaschen und dann 5 min in AP-Färbepuffer kalibriert. Dann wurden 20 mL AP-Färbepuffer mit 66 μ L BCIP-Lösung und 132 μ L NBT-Lösung versetzt und die Membran darin solange geschwenkt, bis eine deutliche Färbung erkennbar wurde.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinexpression in *E. coli*

Für die Proteinexpression in *E. coli* wurde der Expressionsstamm BL21 verwendet. Zunächst wurden 10 mL LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen (Vorkultur). Am folgenden Tag wurden für die Hauptkultur 50 mL LB-Medium mit der Vorkultur auf eine $OD_{600} \sim 0,1$ angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ wachsen gelassen, dann wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Die Hauptkultur wurde für 2 – 6 h bei 30 – 37°C je nach Anforderung des Proteins geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde für 15 min bei 4°C und 4000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 15 mL Lyse-Puffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in eine Rosettenzelle umgefüllt, auf Eis gestellt und 5 min mit einem Ultraschallhomogenisator (Cycle 5, 65% Intensität) behandelt, um die *E. coli*-Zellen aufzuschließen. Die Zellsuspension wurde in 2 mL Reaktionsgefäße umgefüllt, 20 min bei 4°C und 20.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5417R) und das Pellet verworfen. Der Überstand bzw. das Lysat enthielt die löslichen Proteine.

Für die Analyse der Proteinexpression wurde von der uninduzierten und induzierten Zellsuspension eine $OD_{600} \sim 1$ entnommen, für 2 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in SDS-Ladepuffer aufgenommen und 1/10 Volumen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western Blot untersucht.

2.4.2 Proteinexpression mit dem PURE System

Das *Protein synthesis using recombinant elements* System (PURE System) ermöglicht die zellfreie Expression von Proteinen innerhalb weniger Stunden ausgehend von einem PCR-Produkt oder einem Plasmid (Shimizu *et al.*, 2001). Dazu wurden 10 – 50 µL Ansätze aus den Lösungen A und B mit der entsprechenden Menge an Template-DNA laut Angaben des Herstellers bei 37°C für 3 – 8 h inkubiert.

2.4.3 Herstellung von *E. coli* Lysaten und Ribosomenfraktionen

Die Verwendung von *E. coli* Lysaten zusammen mit allen essentiellen Translations-Komponenten ermöglicht die *in vitro* Expression von Proteinen. *E. coli* Lysate wurden nach der Methode von Zubay (1973) hergestellt.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Merkmal	Referenz
BL21 star (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3)</i>	RNase E-Deletion	Invitrogen
JD20094	F ⁻ λ ⁻ <i>rph-1 INV(rrnD, rrnE) lacI^q lacZΔM15 galK2 galK22</i>	RNase HI-Deletion	National Institute of Genetics, Japan

Für die Herstellung der Ribosomenfraktion nach Kudlicki *et al.* (1992) wurden die Ribosomen mittels Zentrifugationsschritt bei 150.000 x g aus dem *E. coli* Lysat sedimentiert und in Ribosomenpuffer aufgenommen.

Für die Ribosomen-Präparation nach Spedding (1990) wurden die mittels Zentrifugation bei 150.000 x g sedimentierten Ribosomen zusätzlich mit zwei Reinigungsschritten mittels Saccharose-Kissen und einem Waschschrift mit Hochsalzpuffer aufgereinigt. Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Lysate und Ribosomenfraktionen wurden von der AG Kalbitzer (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

2.4.4 Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung von Proteinen wurde mittels *immobilised metal ion affinity chromatography* (IMAC, Porath *et al.*, 1975) an einer ÄKTApurifier FPLC-Anlage (GE Healthcare) durchgeführt. Da die aufzureinigenden Proteine einen His-, HN- bzw. HAT-Tag besaßen, wurde die 1 mL HisTALONTM-Cartridge (Clontech) verwendet, bei der es sich um eine Talon-Matrix mit Kobalt-Chelatkomplex handelt. Alle Proben und Puffer wurden zunächst durch einen 0,45 µm Filter gefiltert. Mit einer Flussrate von 1 mL/min wurde die Chromatographiematrix mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer äquilibriert und die zielproteinhaltige Proteinlösung (*E. coli* Lysat) über die Säule gepumpt. Unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine wurden durch das Waschen mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer entfernt. Zur Elution des Zielproteins wurde die Chromatographiematrix mit circa 20 Säulenvolumina Elutionspuffer, der 500 mM Imidazol enthält, gewaschen, bis das Signal der UV-Messzelle keine erhöhte Absorption mehr zeigte. Das Eluat wurde in 0,5 mL Fraktionen gesammelt. Die anschließende Entsalzung des Zielproteins wurde mit einer HiTrapTM-Desalting Säule (GE Healthcare) an der ÄKTApurifier (GE Healthcare) nach dem Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Das aufzureinigende Protein wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min über die Entsalzungssäule

gepumpt und in dem für das jeweilige Zielprotein entsprechenden Lagerpuffer (2-fach konzentriert) eluiert. In den 0,5 mL Fraktionen 1 – 3 konnte das entsalzte Protein aufgefangen werden, Imidazol eluierte in einer späteren Fraktion. Zur Lagerung bei -20°C wurde die Proteinlösung mit 1 Vol 99% Glycerin versetzt.

2.4.5 Fraktionierung von *E. coli* Lysat mittels Gelfiltration

Die Gelfiltration ist ein chromatographisches Verfahren bei dem die zu trennenden, gelösten Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe mehr oder weniger stark in das poröse Netzwerk der Gel-Matrix eindringen und nach abnehmendem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Für die Fraktionierung von *E. coli* Lysat wurde die Gelfiltrationssäule (TSK Gel G4000PWXL, Tosoh) an der FPLC-Anlage (ÄKTApurifier) mit PURE-Puffer äquilibriert und dann 100 µL 2-fach konzentriertes *E. coli* Lysat (RTS, Roche) mit einer Flußrate von 0,5 mL/min über die Säule gepumpt. Das Eluat wurde in 0,5 mL Fraktionen gesammelt und zur Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.4.6) aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

2.4.6 SDS-PAGE

Bei der *sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidmix (37,5:1)	12%	5%
Tris-HCl (pH 8,8)	380 mM	-
Tris-HCl (pH 6,8)	-	126 mM
SDS	0,1%	0,1%
TEMED	0,05%	0,1%
APS	0,1%	0,1%

Die Proben wurden mit 1 x SDS-Laufpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und zusammen mit einem Größenstandard aufgetragen. Die Gele wurden bei 35 mA pro Gel für circa 45 min laufen gelassen.

2.4.7 Coomassie-Färbung von SDS-Gelelen

Für die Coomassie-Färbung wurden SDS-Gele 1 – 4 h in der Coomassie-Färbelösung auf dem Orbitalschüttler inkubiert und anschließend solange in der Entfärbelösung gewaschen bis die Proteinbanden mit ausreichendem Kontrast erkennbar wurden.

2.4.8 Western Blot und Immunfärbung

Beim Western Blot werden Proteine aus einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Dazu wurden zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere auf die, später der Anode zugewandte, Seite einer Gelkassette gelegt. Darauf wurde eine in Transferpuffer getränkte Nitrocellulose-Membran von der gleichen Größe wie das SDS-Gel gelegt. Darauf wurden das SDS-Gel und wiederum zwei getränkte Filterpapiere gelegt. Die Gelkassette wurde

verschlossen und in die Tank-Blot-Kammer gestellt. Der Transferlauf wurde bei 100 V für 60 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran in 3% MTBST für 30 min bei RT geschwenkt um unspezifische Bindungen zu blocken. Die Membran wurde in TBST gewaschen und mit dem ersten Antikörper für 1,5 h bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran 2 x für 5 min in TBST gewaschen und mit einem Antikörper-HRP-Konjugat für 1,5 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte enzymatisch mittels *enhanced chemiluminescence* (ECL). Dazu wurde die Membran mit dem BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche) benetzt und im Chemolumineszenz Imager (Intas) fotografiert. Bei unzureichender Signalstärke wurde die Membran kurz in TBST gewaschen, mit dem *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce) benetzt und erneut im Chemolumineszenz Imager fotografiert.

2.4.9 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde kolorimetrisch mit dem *DC Protein Assay* (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Erstellung einer Kalibrierungskurve wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA verwendet. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm wurde im Plattenphotometer (Tecan) ausgelesen.

Alternativ wurden Verdünnungsreihen von Proben und Verdünnungsreihen von Standardproteinen mittels SDS-PAGE auf einem Gel aufgetrennt und anschließend ein Nachweis durch Coomassie-Färbung oder Western Blot mit Immunfärbung durchgeführt. Durch den Vergleich der Bandenstärken zwischen Proben- und Standardproteinen wurde die Konzentration des Proteins abgeschätzt.

2.4.10 ELISA

Mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) lässt sich die Affinität zweier Proteine zueinander bestimmen. Dazu wurden 50 ng Protein in 100 µL PBS-Puffer pro Vertiefung an MaxiSorp-96-well Platten über Nacht bei 37°C gebunden. Jede Vertiefung wurde dreimal mit 200 µL PBST gewaschen und zum Abblocken unspezifischer Bindungen mit 200 µL MPBST gefüllt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernen des Puffers und dreimaligem Waschen mit 200 µL PBST wurden je 100 µL einer Verdünnungsreihe des potentiell interagierenden Proteins zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit je 200 µL PBST entfernt. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 100 µL des ersten Antikörpers für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der Nachweisantikörper, ein HRP-Konjugat, zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden 100 µL TMB-Substrat in jede Vertiefung gegeben und die Platte solange bei RT inkubiert bis eine deutliche Blaufärbung erkennbar wurde. Dann wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wurde im Plattenphotometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und um den Referenzwert der MaxiSorp-96-well Platte bei 570 nm korrigiert.

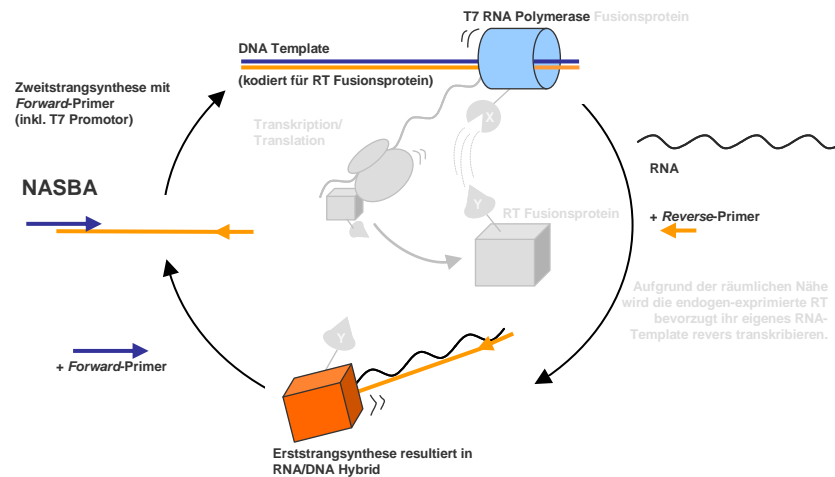
2.4.11 Aktivitätstest mit dem *RetroSys™ C-Type RT Activity Kit*

Das *RetroSys™ C-type RT Activity Kit* (Innovagen) ermöglicht die quantitative Bestimmung der Mn^{2+} -abhängigen Reversen Transkriptase-Aktivität von Typ C-Retroviren, wie die MMuLV RT. Das Kit enthält Mikrotiterplatten-Streifen mit immobilisierten PolyA-Molekülen und Oligo-dT-Primern zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Bei Vorhandensein einer aktiven Reversen Transkriptase baut diese das Bromodesoxyuridintriphosphat (BrdUTP), ein Analogon zu dTTP, in den Zweitstrang ein. Ein gegen BrdUTP gerichtetes Antikörperkonjugat bindet an den neu synthetisierten DNA-Strang und ermöglicht über eine Farbreaktion mittels Alkalischer Phosphatase die Quantifikation.

Der Aktivitätstest wurde nach den Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt: Die Vertiefungen einer PolyA-Platte wurde für 30 – 60 min mit 150 μ L Reaktionsmix bei 33°C inkubiert. Zeitgleich wurden die MMuLV RT-Proben (Kapitel 2.4.2) im Bereich von 10^{-2} – 10^{-4} verdünnt. Jeweils 50 μ L der MMuLV RT-Verdünnungen wurden in eine Vertiefung der PolyA-Platte mit Reaktionsmix gegeben und für 3 h bei 33°C und leichtem Schütteln inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch viermaliges Waschen der Vertiefungen mit jeweils 350 μ L Waschpuffer. Es wurden 100 μ L des Antikörperkonjugats (*RT Product Tracer*) in den Vertiefungen für 90 min bei 33°C inkubiert. Zum Entfernen von nicht-gebundenem Antikörperkonjugat wurde viermal mit jeweils 350 μ L Waschpuffer gewaschen. Dann wurden in jeder Vertiefung 200 μ L *AP Substrate solution* bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm nach 1 h und 2 h im Plattenphotometer (Tecan) ausgelesen.

3 Ergebnisse

3.1 Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)



Die NASBA ist eine Kombination aus *in vitro* Transkription und Reverser Transkription und wird unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide zur isothermen Amplifikation von Nukleinsäuren eingesetzt (Compton, 1991). In dem zu etablierenden *in vitro* Evolutionssystem soll der Replikationsschritt in Form einer DNA-Amplifikation mittels NASBA realisiert werden.

3.1.1 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription, als ein Teilschritt der NASBA, wurde nach Schenborn und Mierendorf (1985) durchgeführt und hinsichtlich der Mg^{2+} -Konzentration optimiert. Als Template fungierte das Renilla Luciferase-Gen, das mittels PCR (Primer 43/6) aus dem Vektor pRL-TK (Promega) amplifiziert, in das Vektorgerüst pSc kloniert (pSc-Renilla) und mittels Standard-Primern (1/2) erneut amplifiziert wurde. Die *in vitro* Transkription mit einer Magnesium-Konzentration von 5 mM ergab kein RNA-Produkt (Daten nicht gezeigt). Erst ab einer Mg^{2+} -Konzentration von 11 mM konnte eine effiziente Transkription des 1,2 kb großen Templates (Renilla) beobachtet werden. Eine weitere Steigerung der Mg^{2+} -Konzentration führte dazu, dass kleinere RNA Moleküle bevorzugt transkribiert wurden (Abb. 6). Die 400 Basen-Bande in der Template-Spur und in allen Reaktionsansätzen ist wahrscheinlich ein Artefakt bei der Auftrennung doppelsträngiger DNA mittels denaturierender PAGE.

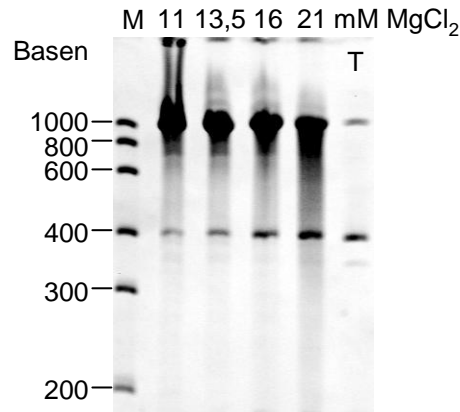


Abb. 6: Optimale Mg^{2+} -Konzentration in der *in vitro* Transkription

In vitro Transkriptionen mit 32 ng/ μ L Template (Renilla) und den angegebenen Konzentrationen an $MgCl_2$ wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Aliquots (2 μ L) wurden mittels denaturierender PAGE (4%, 7 M Harnstoff) aufgetrennt. T: 65 ng Template (Renilla). M: Größenstandard.

3.1.2 NASBA

Im Gegensatz zur „klassischen“ NASBA (Amplifikation ausgehend von RNA) werden zur Amplifikation von DNA-Molekülen mittels NASBA zum Anfügen der T7 Promotor-Sequenz zwei zusätzliche Denaturierungsschritte bei 95°C benötigt (Sooknanan *et al.*, 1995). Verglichen mit dem Nachweis von RNA sinkt die Sensitivität bei der Amplifikation von DNA-Molekülen deutlich ab. Voisset *et al.* (2000) konnten bei der NASBA-Amplifikation eines linearisierten Plasmids erst ab einer Molekülanzahl von 10^4 ein Signal mittels ELOSA detektieren.

Da die in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Templates bereits eine T7 Promotor-Sequenz am 5'-Ende enthalten, ist die Amplifikation in der zyklischen Phase ohne vorhergehende Denaturierungsschritte möglich (Abb. 7).

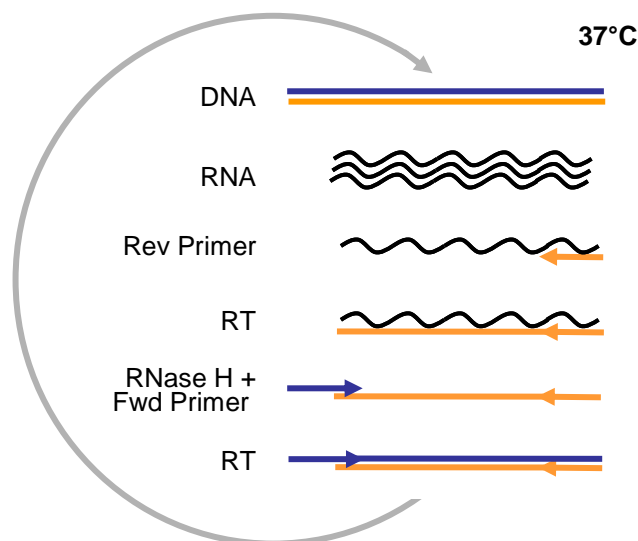


Abb. 7: Schematischer Ablauf der NASBA in dieser Arbeit

Orange und blaue Linien stellen jeweils einen DNA-Einzelstrang dar, gewellte schwarze Linien stellen RNA-Moleküle dar. Blaue Pfeile stehen für den *Forward*-Primer (mit T7 Promotor-Sequenz), orange Pfeile für den *Reverse*-Primer. Die Reaktion wird isotherm bei 37°C durchgeführt. RT: Reverse Transkriptase.

Die NASBA beruht auf der simultanen Aktivität der T7 RNA Polymerase (T7 RNAP) und einer Reversen Transkriptase, beispielsweise aus dem *Moloney murine leukaemia virus* (MMuLV RT) (Roth *et al.*, 1985). Im ersten Schritt wird das DNA-Template von der T7 RNA Polymerase in mRNA transkribiert, um dann von der MMuLV RT in cDNA umgeschrieben zu werden. Um den Effekt der simultanen Aktivität der Enzyme zu untersuchen, wurden NASBA Reaktionen mit jeweils einem der beiden Enzyme bzw. mit beiden Enzymen durchgeführt. Als Template fungierte das aus dem pSc-Renilla amplifizierte, aufgereinigte PCR-Produkt (Primer 1/2), das neben der kodierenden Sequenz für die Renilla, einen T7 Promotor und Hybridisierungsbereiche für die NASBA-Primer (441/442) enthielt. Der NASBA-Ansatz mit beiden Enzymen resultierte in einer Doppelbande, dabei läuft die cDNA (*) oberhalb der RNA (**), die aufgrund von Sekundärstrukturen ein anderes Laufverhalten zeigte (Abb. 8, Spur 1). Das NASBA-Produkt besteht immer aus einem Gemisch aus DNA und RNA, da die T7 RNAP mit einer weitaus höheren Effizienz RNA transkribiert, als die MMuLV RT cDNA-Moleküle synthetisieren kann. So berichten Sooknanan *et al.* (1995) einen 20-fachen Überschuss von RNA gegenüber DNA nach einer 90-minütigen NASBA. Bei dem Ansatz, der als einziges Enzym die T7 RNAP enthielt, konnte die entstandene RNA als distinkte Bande im Agarosegel detektiert werden (Abb. 8, Spur 2). Die NASBA, die als einziges Enzym die MMuLV RT enthielt, ergab kein detektierbares Produkt (Abb. 8, Spur 3). Der NASBA-Ansatz mit beiden Enzymen, aber ohne Template, zeigte im Agarosegel einen Schmier im Bereich unterhalb von 700 bp (Abb. 8, Spur 4). Der Effekt, dass auch Oligonukleotide als Template für die T7 RNAP fungieren können, wurde bereits von Krupp (1989) beschrieben. Verglichen mit einer NASBA, die mit RNA-Template gestartet wird, resultierte die mit DNA-Template gestartete NASBA erwartungsgemäß in einem Amplifikations-Produkt aus RNA- und DNA-Molekülen und sollte in den folgenden Versuchen weiter optimiert werden.

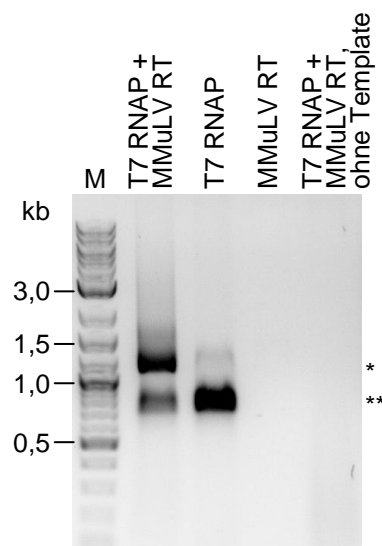


Abb. 8: Analyse der NASBA

NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,2 μ M je Primer (441/442), 0,5 ng/ μ L Template (Renilla) und den Enzymen wie angegeben wurden für 90 min bei 37°C inkubiert. Aliquots (2 μ L) wurden in RNase A-haltigem Laufpuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. DNA (*), RNA (**). M: Größenstandard.

3.1.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription stellt einen Teilschritt der NASBA dar. Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die, ausgehend von RNA-Molekülen und entsprechend komplementären Oligonukleotiden, cDNA-Moleküle synthetisiert. Neben der Polymerase-Aktivität beruht die Reverse Transkription auch auf der Aktivität einer RNase H, die den RNA-Anteil im RNA/DNA-Hybrid entfernt, so dass die Zweitstrangsynthese ablaufen kann. Die am häufigsten verwendeten Reversen Transkriptasen sind die *Avian myeloblastosis virus* (AMV) RT (Houts *et al.*, 1979), die *Human immunodeficiency virus* (HIV) RT (Farmerie *et al.*, 1987) oder die MMuLV RT. Während die MMuLV RT eine ausreichende intrinsische RNase H-Aktivität besitzt, müssen Reverse Transkriptionen mit der AMV RT oder der HIV RT durch extrinsische RNase H supplementiert werden. Kotewicz *et al.* (1988) isolierten eine MMuLV RT-Variante ohne RNase H Aktivität und zeigten, dass diese RNase H defiziente MMuLV RT bei der Synthese von cDNA-Molekülen größer 6,0 kb eine höhere Effizienz hat. Die für lange cDNA-Moleküle benötigte Inkubationszeit führt zu einer Inhibierung der cDNA-Synthese durch die RNase H Aktivität und resultiert dann in cDNA-Abbruchfragmenten (Gerard *et al.*, 1997). Es wurden verschiedene RTs auf ihre Eignung in der NASBA getestet. Bei Verwendung der AMV RT bzw. HIV RT konnte, mit oder ohne Zugabe von RNase H, ein schwaches NASBA-Amplifikationssignal im Agarosegel detektiert werden (Abb. 9, Spuren 4 – 7). Die RNase H deletierte MMuLV RT führte in diesem Versuch zu keinem Amplifikationsprodukt, es konnte aber in früheren Versuchen mit der zehnfachen Unit-Menge an MMuLV RT (RNase H⁻) und entsprechend titrierter RNase H ein NASBA-Produkt erzeugt werden (Daten nicht gezeigt).

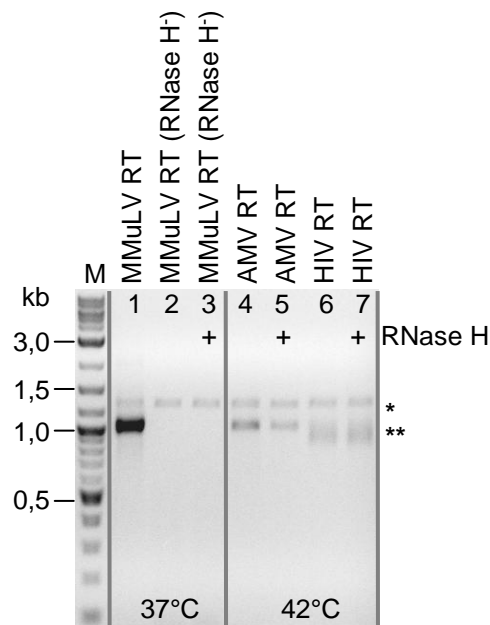


Abb. 9: Test verschiedener RTs zur Verwendung in der NASBA

NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 5 ng/ μ L Template (Renilla, *), 0,2 μ M je Primer (441/442) und 0,325 U/ μ L Reverser Transkriptase wie angegeben wurden für 90 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert. (+) Ansätze enthielten zusätzlich 0,005 U/ μ L RNase H. Aliquots (2 μ L) wurden in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. NASBA-Produkt (**). M: Größenstandard.

Die stärkste NASBA-Amplifikation wurde mit der MMuLV RT mit intrinsischer RNase H Aktivität erreicht (Abb. 9, Spur 1). Dieses Enzym ist für die NASBA unter den gewählten Reaktionsbedingungen am besten geeignet und sollte somit auch für das zu etablierende Evolutionssystem verwendet werden.

3.1.4 Einfluss der Inkubationszeit

Neben der isothermen Inkubation wird als weiterer Vorzug der NASBA die relativ kurze Inkubationszeit von 90 Minuten zur Amplifikation eines RNA-Templates um den Faktor 10^9 beschrieben (Compton, 1991; Jean *et al.*, 2001). Da in dieser Arbeit die NASBA mit einem DNA-Template gestartet wurde, sollte die DNA-Amplifikation in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden. Dazu wurden NASBA Reaktionen über einen Zeitraum von 12 h bei 37°C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben genommen (Abb. 10 A). Nach 60 – 90 min Inkubationszeit konnte ein deutliches Amplifikations-Signal detektiert werden. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten im Agarosegel zeigte einen linearen Anstieg der DNA-Amplifikation in den ersten 90 min, bevor eine Sättigung erreicht wurde (Abb. 10 B). Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle folgenden NASBA Reaktionen für mindestens 90 min inkubiert.

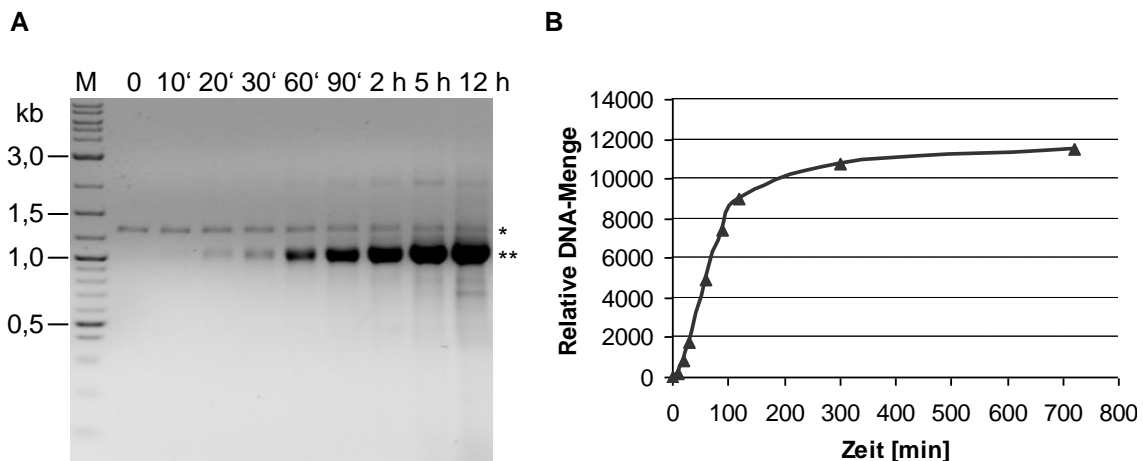


Abb. 10: Einfluss der Inkubationszeit auf die NASBA

(A) NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 5 ng/μL Template (Renilla, *), 0,2 μM je Primer (441/442) wurden über einen Zeitraum von 12 h bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots (2 μL) entnommen und in RNase A-haltigem Ladebuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. M: Größenstandard.

(B) Densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten des NASBA-Produkts (Abb. A, **) mittels Bildauswertungs-Software (Scion Image).

3.1.5 Bestimmung der optimalen Inkubationstemperatur

Die optimale Temperatur der NASBA hängt von der verwendeten Reversen Transkriptase ab. Die AMV RT und HIV RT besitzen ein Temperaturoptimum bei 42°C, die MMuLV RT hingegen bei 37°C. Höhere Temperaturen wirken unterstützend auf die Relaxation von RNA-Sekundärstrukturen und verbessern dadurch die Sensitivität von RT-PCR-Reaktionen (Fuchs *et al.*, 1999). Die Inkubation der NASBA bei Temperaturen zwischen 35°C und 43°C zeigte, dass die optimale Inkubationstemperatur zwischen 37°C und 39°C liegt (Abb. 11). Für die geplante

Kopplung der NASBA mit einem *in vitro* Proteinsynthesesystem ergab sich eine optimale Inkubationstemperatur von 37°C.

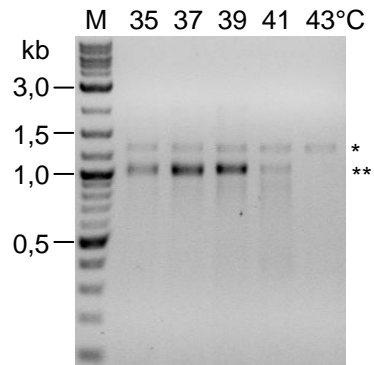


Abb. 11: Bestimmung der optimalen Inkubationstemperatur der NASBA

NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 5 ng/μL Template (Renilla, *), 0,2 μM je Primer (441/442) wurden bei angegebener Temperatur für 90 min inkubiert und Aliquots (2 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. NASBA-Produkt (**). M: Größenstandard.

3.1.6 Bestimmung der optimalen Template-Konzentration

Die NASBA wird hauptsächlich für die Amplifikation von RNA Molekülen verwendet, wobei laut Literatur bereits 10 Moleküle ausreichen, um ein detektierbares Amplifikationssignal zu erreichen. Eine mit DNA-Template angeimpfte NASBA ist weniger sensitiv und benötigt mindestens 10^4 DNA-Moleküle pro Reaktionsansatz, um ein Amplifikationssignal mittels *Enzyme-linked oligosorbent assay* (ELOSA) zu detektieren (Voisset *et al.*, 2000). NASBA Reaktionen wurden mit 0,05 – 10 ng/μL Template (Renilla) inkubiert, das entspricht $7,1 \times 10^8$ – $1,4 \times 10^{11}$ Molekülen pro Reaktion. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen musste die NASBA mit mindestens $7,1 \times 10^9$ Molekülen (= 0,5 ng/μL) des 1305 Basenpaare großen Templates angeimpft werden, um ein Amplifikationsprodukt zu visualisieren (Abb. 12).

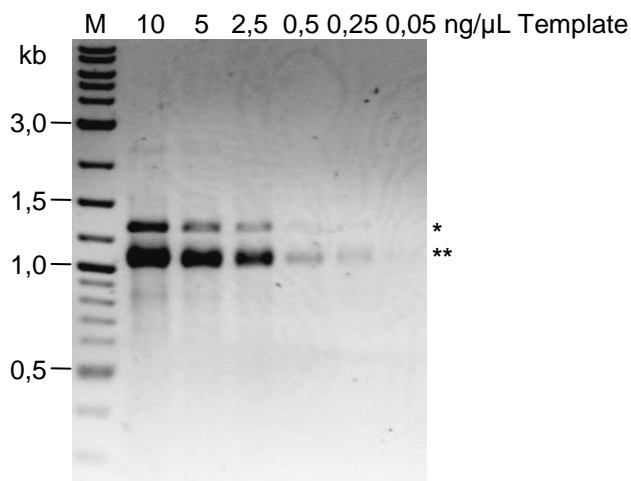


Abb. 12: Bestimmung der optimalen Template-Konzentration in der NASBA

NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,2 μM je Primer (441/442) und Template (Renilla, *) - Konzentrationen wie angegeben wurden für 90 min bei 37°C inkubiert und Aliquots (2 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. NASBA-Produkt (**). M: Größenstandard.

Wahrscheinlich sind die höhere Sensitivität der ELOSA-Technologie gegenüber der Agarosegelelektrophorese, sowie die fünffache Länge des Renilla-Templates, gegenüber dem 200 bp kurzem von Voisset verwendeten Template, Gründe für die benötigte höhere Molekülanzahl.

3.1.7 Visualisierung der NASBA-Kinetik mit DNA-interkalierenden Agenzien

Die DNA-Amplifikationskinetik in der NASBA sollte unter der Verwendung von DNA-interkalierenden Agenzien im *real-time Cyclor* quantifiziert werden. Kriterien zur Auswahl eines geeigneten Fluoreszenz-Farbstoffes waren: erstens, eine ausreichende Sensitivität, um bereits kleine Mengen des Amplifikationsprodukts zu detektieren und zweitens, keine Beeinflussung der NASBA bzw. der Reaktionskinetik durch das Interkalieren des Farbstoffes. Für den Farbstoff *Thiazole orange* (TO) konnte eine 19.000-fache Fluoreszenz-Steigerung bei Bindung an dsDNA-Moleküle im Vergleich zum ungebundenen Zustand beobachtet werden (Glazer & Rye, 1992). Gebinoga & Oehlenschläger (1996) berichten, dass die Verwendung von *Thiazole orange* in einer DNA-Amplifikationsreaktion (3SR) keine Fehler während der Reversen Transkription verursachte. Parallel zu *Thiazole orange* (TO-PRO-1, Invitrogen) wurde SYBR Green I (Bio-Rad), ebenfalls ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, getestet. Dazu wurden die Farbstoffe der NASBA zugesetzt und die Ansätze im *real-time Cyclor* inkubiert. Die Vermessung der NASBA mit SYBR Green I zeigte keine Korrelation zwischen dem im *real-time Cyclor* gemessenen Fluoreszenz-Signal und der DNA-Amplifikation, die mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben abgeschätzt wurde (Daten nicht gezeigt). Bei der Verwendung von TO-PRO-1 zeigte sich eine Relation zwischen der gemessenen Fluoreszenz-Intensität und der DNA-Amplifikationsrate (Abb. 13).

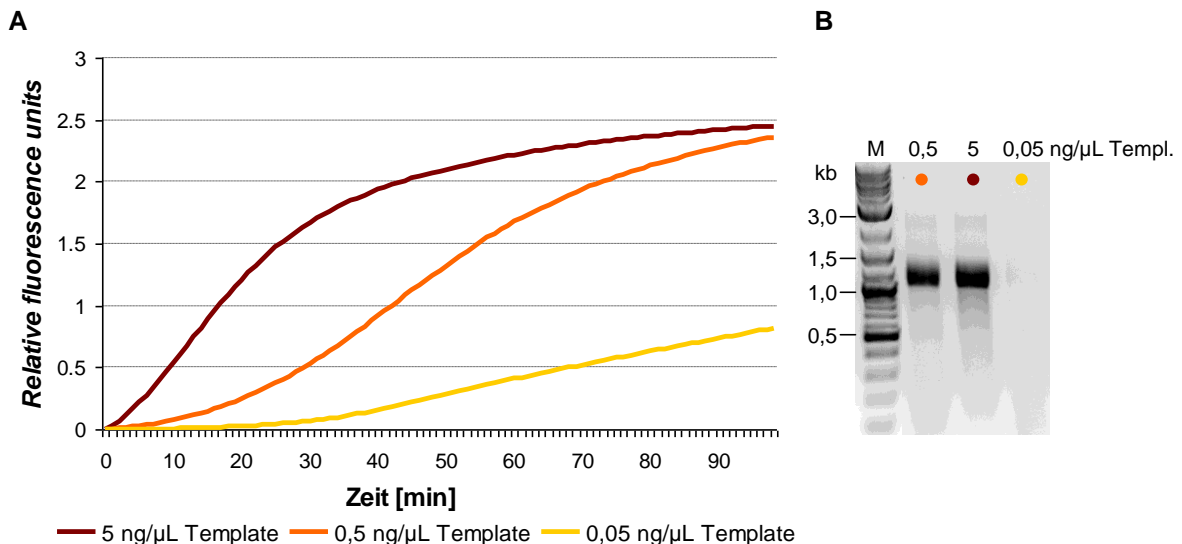


Abb. 13: Visualisierung der DNA-Amplifikation in der NASBA

(A) NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,2 μM je Primer (441/442), 5 μM TO-PRO-1 und 0,05 – 5 ng/μL Template (Renilla) wurden für 99 min bei 37°C im *real-time Cyclor* vermessen.

(B) Aliquots (2 μL) wurden in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. Farbige Punkte verweisen auf die entsprechende Fluoreszenz-Kurve. M: Größenstandard.

3.1.8 Optimierung des NASBA *Forward*-Oligonukleotids

Die Gestaltung des NASBA *Forward*-Oligonukleotids hat einen erheblichen Einfluss auf die Effizienz der NASBA. Neben der T7 Promotor-Sequenz enthält das NASBA *Forward*-Oligonukleotid einen zum 3'-Ende des Erststranges komplementären Bereich, der optimalerweise 20 – 30 Nukleotide lang ist, einen GC-Gehalt von 40 – 60% aufweist und mit einem Desoxyadenosin-Nukleotid endet (Deiman *et al.*, 2002). Zur Optimierung des NASBA *Forward*-Oligonukleotids wurden diese mit Hybridisierungsbereichen zwischen 6 – 42 Basenpaaren konstruiert (Kapitel 2.1.8) und in der NASBA getestet. Die stärkste NASBA-Amplifikationsrate wurde mit dem Oligonukleotid erzielt, dessen Hybridisierungsbereich 18 Basenpaare lang war (18 bp_fwd) (Abb. 14, rote Kurve).

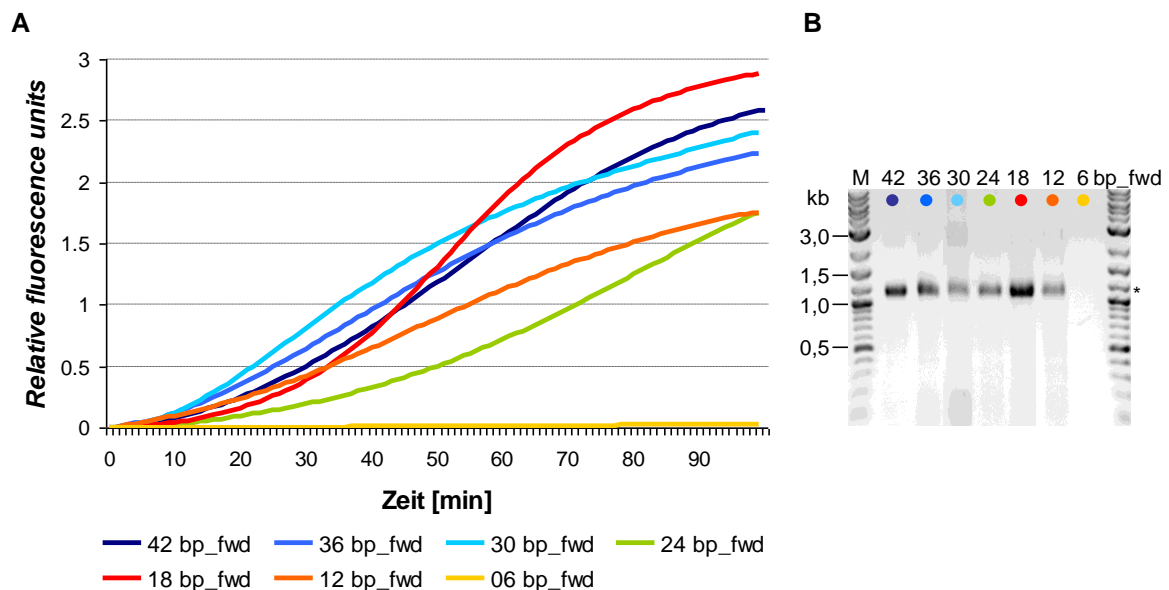


Abb. 14: Optimierung des NASBA *Forward*-Oligonukleotids

(A) NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,5 ng/μL Template (Renilla) und 5 μM TO-PRO-1 wurden mit 0,2 μM des angegebenen NASBA *Forward*-Oligonukleotids (442 als NASBA *Reverse*-Oligonukleotid) für 99 min bei 37°C im *real-time Cyclor* vermessen.
(B) Aliquots (2 μL) wurden in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. Farbige Punkte weisen auf die entsprechende Fluoreszenz-Kurve. NASBA-Produkt (*). M: Größenstandard.

3.1.9 Einfluss von Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) wird in PCR-Reaktionen als Additiv für die Amplifikation von GC-reichen Templates eingesetzt, da es die Sekundärstrukturen destabilisiert (Varadaraj und Skinner, 1994) und so die Amplifikation unspezifischer Fragmente verringert. In der NASBA zeigt DMSO ebenfalls einen Sekundärstruktur-reduzierenden Effekt und ermöglicht so die Amplifikation von Nukleinsäuren auch bei niedrigen Temperaturen. Für die Optimierung des DMSO-Gehaltes in der NASBA wurden Ansätze mit 5 – 15% DMSO für 90 min bei 37°C im *real-time Cyclor* vermessen. Eine effiziente DNA-Amplifikation innerhalb der ersten 90 Minuten konnte erst ab einer DMSO-Konzentration von 10% detektiert werden (Abb. 15).

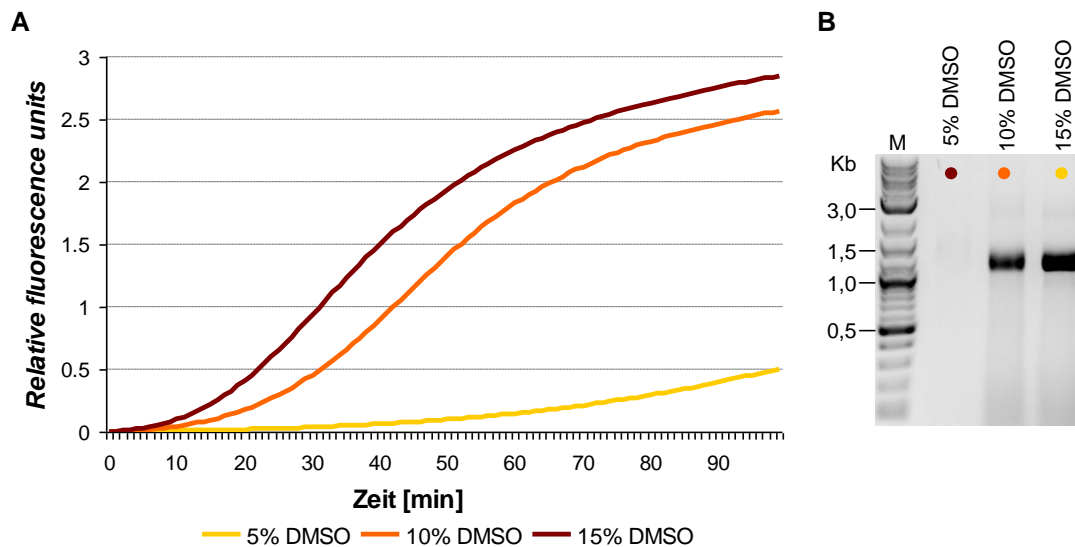


Abb. 15: Einfluss von DMSO auf die NASBA

(A) NASBA Reaktionen mit 0,5 ng/μL Template (Renilla), 0,2 μM je Primer (441/442), 5 μM TO-PRO-1 und 5 – 15% DMSO wurden für 99 min bei 37°C im *real-time Cyclor* vermessen. (B) Aliquots (2 μL) wurden in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. Farbige Punkte verweisen auf die entsprechende Fluoreszenz-Kurve. M: Größenstandard.

In Kapitel 3.4.5 konnte gezeigt werden, dass DMSO bereits ab einer Konzentration von 5% inhibierend auf die *in vitro* Proteinsynthese wirkt. Als Voraussetzung für die Kombination von NASBA und *in vitro* Proteinsynthese muss die NASBA ohne DMSO optimiert werden. Dazu wurden NASBA Reaktionen ohne und mit 10% DMSO über einen Zeitraum von 12 h bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, dass die NASBA ohne DMSO (Abb. 16, Spuren 1 – 3) 3 – 6 mal länger inkubiert werden muss, um die Effizienz einer NASBA mit DMSO (Abb. 16, Spuren 4 – 6) zu erreichen. Da der Fluoreszenzfarbstoff TO-PRO-1 in DMSO gelöst werden musste, wurde in den folgenden Versuchen auf die Visualisierung der NASBA im *real-time Cyclor* verzichtet.

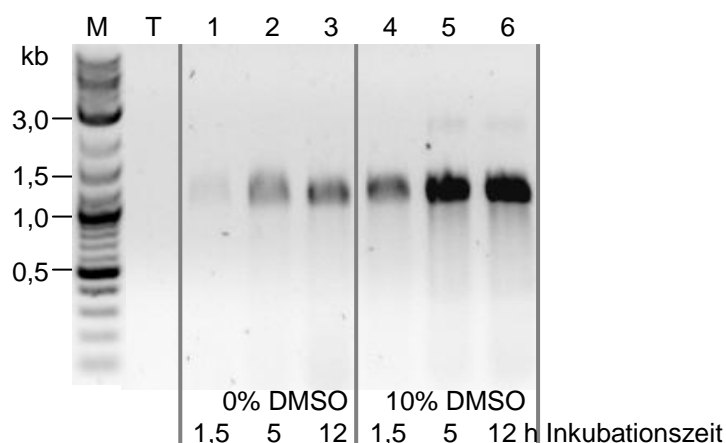


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der NASBA in Abhängigkeit von DMSO

NASBA Reaktionen mit 0,5 ng/μL Template (Renilla), 0,2 μM je Primer (634/442) und 0% oder 10% DMSO wurden für 1,5 h, 5 h bzw. 12 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (2 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. T: 1 ng Template (Renilla). M: Größenstandard.

3.1.10 Reaktionsbedingungen für DNA-Templates größer 2,0 kb

Die effiziente Amplifikation mit der NASBA ist laut Deiman *et al.* (2002) nur mit Templates zwischen 100 – 250 Nukleotiden möglich. Da das *in vitro* Evolutionssystem auf der Replikation des MMuLV RT-Gens in Fusion mit einem der beiden Bindepartner (2,5 kb MMuLV RT + x kb Bindepartner) basiert, muss die Amplifikation von Templates größer 3,0 kb mit der NASBA durchführbar sein. Die vorhergehenden Optimierungsschritte der NASBA hinsichtlich Inkubationszeit und Template-Konzentration konnten nur bedingt auf längere DNA-Templates übertragen werden, da je nach GC-Gehalt und vorliegenden Sekundärstrukturen die DNA-Amplifikation andere Reaktionsbedingungen benötigte. Zur Bestimmung der optimalen Template-Konzentration wurden NASBA Reaktionen mit 0,5 bzw. 5 ng/μL des 2,5 kb großen MMuLV RT-Templates inkubiert (Abb. 17 A). Weiterhin wurden NASBA Reaktionen mit dem 3,3 kb großen Renilla-MMuLV RT-Template über einen Zeitraum von 9 h bei 37°C inkubiert (Abb. 17 B). Als Schlussfolgerung wurden NASBA Reaktionen mit einem Template größer als 2,0 kb in allen folgenden Versuchen mit 5 ng/μL Template gestartet und für mindestens 3 h bei 37°C inkubiert.

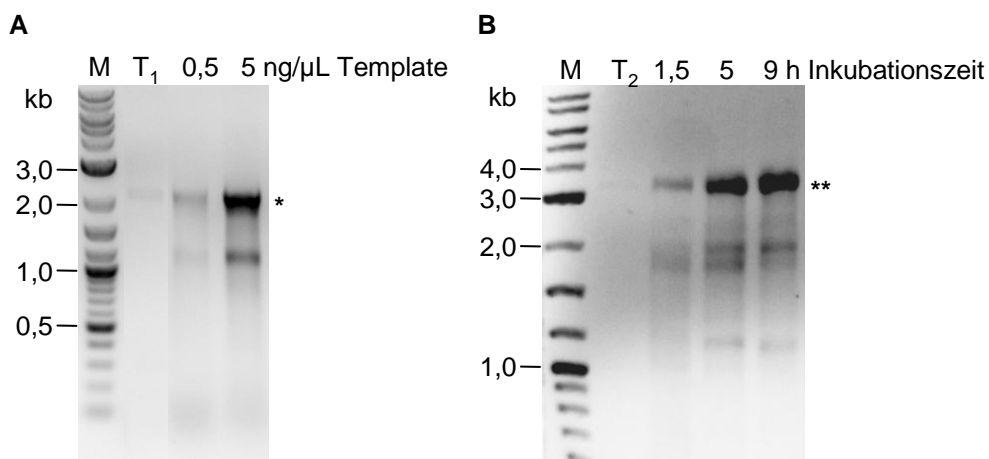


Abb. 17: NASBA Reaktionsbedingungen für DNA-Templates größer 2,0 kb

(A) NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,2 μM je Primer (441/442) und 0,5 bzw. 5 ng/μL Template (MMuLV RT) wurden für 1,5 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (2 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. T₁: 10 ng Template (MMuLV RT). NASBA-Produkt (*).

(B) NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,2 μM je Primer (634/442) und 5 ng/μL Template (Renilla-MMuLV RT) wurden für 1,5 h, 5 h bzw. 9 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (0,2 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. T₂: 1 ng Renilla-MMuLV RT-Template. NASBA-Produkt (**). M: Größenstandard.

3.1.11 Einfluss von Additiven auf die NASBA mit Templates größer 2,0 kb

Für die Optimierung der Amplifikation von DNA-Templates größer als 2,0 kb wurden verschiedene Additive, die vor allem im Bereich der RT-PCR zu einer nachweislich gesteigerten Ausbeute führten, getestet. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die getesteten Additive und deren Effekte bei der DNA-Amplifikation während der NASBA.

Tab. 1: Additive für die NASBA mit Templates größer 2,0 kb

Additiv	Angenommener Effekt	Referenz	Effekt in NASBA *
Polyole und Zucker (Sorbitol, Glycerin, Ethylenglykol)	Schutz vor thermischer Denaturierung	Back <i>et al.</i> (1979)	++ (Ethylenglykol) + (Glycerin) - (Sorbitol)
T4 Gene 32 Protein	Höhere Ausbeute, bessere Prozessivität der RT	Villalva <i>et al.</i> (2001)	-
<i>single-strand DNA-binding protein</i> (SSBP)	Stabilisierung einzelsträngiger DNA	Davydova & Rothman-Denes (2003)	-
Klenow Fragment; DNA Polymerase I	Zweitstrangsynthese	Gubler <i>et al.</i> (1987)	-
<i>yeast inorganic pyrophosphatase</i> (YIPP)	Hydrolyse von anorganischem Pyrophosphat	Cunningham & Ofengand (1990)	+
DMSO	Destabilisierung von Sekundärstrukturen	Sun <i>et al.</i> (1993); Sooknanan <i>et al.</i> (1995)	+++
Betain	Destabilisierung von Sekundärstrukturen	Rajendrakumar <i>et al.</i> (1997); Henke <i>et al.</i> (1997); Spiess & Ivell (2002)	++
Trehalose (+ Betain)	Reverse Transkription langer cDNA-Moleküle	Spiess & Ivell (2002)	+
Inosintriphosphat (ITP)	Verbesserung der NASBA mit GC-reichen Templates	Nakahara <i>et al.</i> (1998)	-

* NASBA Reaktionen mit 5 ng/μL Template (MMuLV RT), 0,2 μM je Primer (441/442) und dem jeweils angegebenen Additiv wurden für 5 h bei 37°C inkubiert. Aliquots (2 μL) wurden in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Bandenstärken quantifiziert (Amplifikationsrate: +++ hoch, ++ moderat, + niedrig, - keine Amplifikation).

Die Zugabe von 10% DMSO resultierte in der stärksten DNA-Amplifikation. 0,5 M Betain bzw. 10% Ethylenglykol in der NASBA führten zu einem detektierbaren Amplifikationssignal. Die Zugabe von 0,005 U/μL YIPP, 10% Glycerin bzw. 0,1 M Trehalose resultierte in einer geringeren Amplifikationsrate. Alle anderen Additive ermöglichten keine detektierbare DNA-Amplifikation in der NASBA.

Da DMSO in einem kombinierten Ansatz aus NASBA und *in vitro* Proteinsynthese letztere inhibieren würde, sollte Betain als Alternative zu DMSO eingesetzt werden. Ein weiterer Versuch mit Betain und Trehalose zeigte, dass die Zugabe von 225 mM Betain in der NASBA zu einer circa 3-fachen Erhöhung der DNA-Amplifikationsrate führte (Abb. 18, Spur 2). Der Zusatz von 50 mM Trehalose hatte einen leicht positiven Effekt (Spur 3). Die Zugabe von 225 mM Betain und 50 mM Trehalose zusammen führte zu keiner weiteren Steigerung der DNA-Amplifikation (Spur 4). Da die *in vitro* Proteinsynthese durch die Zugabe von 250 mM Betain um den Faktor 2 gesteigert werden konnte (siehe Kapitel 3.4.5), wurde Betain in den

kombinierten Ansätzen aus NASBA und *in vitro* Proteinsynthese in einer Konzentration zwischen 225 – 500 mM eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.8).

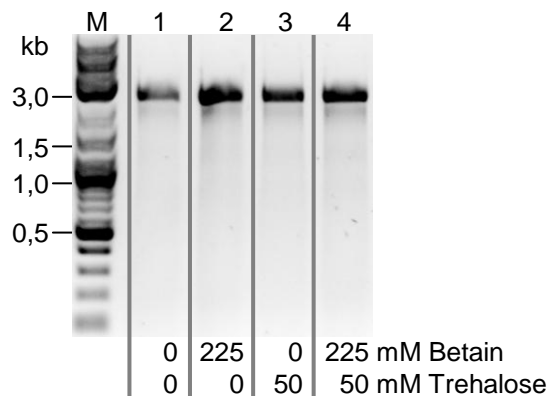


Abb. 18: Einfluss von Betain und Trehalose auf die NASBA

NASBA Reaktionen ohne DMSO, mit 5 ng/μL Template (MMuLV RT), 0,2 μM je Primer (634/442) und den angegebenen Additiven wurden für 5 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (2 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. M: Größenstandard.

3.1.12 Limitationen der NASBA

Bei der Reversen Transkription lagert sich zunächst das *Reverse*-Oligonukleotid an das 3'-Ende des RNA Moleküls an, so dass die MMuLV RT einen doppelsträngigen Bereich vorfindet, von dem aus sie die Erststrangsynthese starten kann. Es entsteht ein RNA/DNA-Hybrid und der RNA-Anteil wird von der RNase H abgebaut. Es folgt die Anlagerung des *Forward*-Oligonukleotids und die Synthese des Zweitstranges. Der Einbau der Oligonukleotide während der NASBA wurde untersucht, indem jeweils eines der beiden Oligonukleotide biotinyliert in die NASBA eingesetzt wurde. Die Proben wurden mittels Southern Blot analysiert und mit einem Streptavidin-AP-Konjugat nachgewiesen. Die NASBA mit biotinyliertem *Reverse*-Oligonukleotid ergab neben dem Volllängen-NASBA-Produkt (*) viele Abbruchfragmente im Bereich von 150 – 1000 Basen (Abb. 19, Spur 2). Diesen verkürzten einzelsträngigen DNA-Fragmenten fehlte am 3'-Ende der Hybridisierungsbereich für das *Forward*-Oligonukleotid. Dadurch konnte der Einbau des *Forward*-Oligonukleotids verglichen mit dem Einbau des *Reverse*-Oligonukleotids nur mit wesentlich geringerer Effizienz ablaufen. Dieser Effekt resultiert in der nachfolgenden Zweitstrangsynthese in einer verringerten Ausbeute an Volllängen-NASBA-Produkt (Abb. 19, Spur 1). Der ineffiziente Einbau des *Forward*-Oligonukleotids wurde auch von Sooknanan *et al.* (1995) beschrieben. Für das zu etablierende Evolutionssystem bedeutet dies eine Akkumulation kleinerer Abbruchfragmente, bei gleichzeitiger Ausdünnung des Volllängen-Templates und dadurch bedingt die Gefahr des frühzeitigen Absterbens der Reaktion.

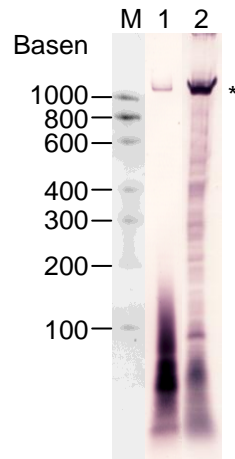


Abb. 19: Einbau der Oligonukleotide während der NASBA

NASBA Reaktionen wurden mit 4 ng/ μ L Template (Renilla), 10% DMSO und 0,2 μ M je Oligonukleotid (634/442 in Spur 1 und 441/635 in Spur 2) für 15 h bei 37°C inkubiert. Aliquots (2 μ L) wurden mittels denaturierender Gradienten-PAGE aufgetrennt und das NASBA-Produkt (*) mittels Southern Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Streptavidin-AP-Konjugat. Der Größenstandard wurde separat mit Ethidiumbromid gefärbt und nachträglich an den Southern Blot angefügt. M: Größenstandard.

Die Klonierung der NASBA-Produkte resultierte in den ersten Versuchen in Vektor-Religanden ohne Insert. Zunächst wurde angenommen, dass die endständigen Restriktionsschnittstellen durch Exonukleasen abgedaut wurden. Klonierungsversuche mit dem *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* (Invitrogen) zur Klonierung des NASBA-Produkts unabhängig von den Restriktionsschnittstellen, blieben jedoch erfolglos (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob das NASBA-Produkt - wie angenommen - aus doppelsträngigen DNA-Molekülen besteht. Der Restriktionsverdau des NASBA-Produkts an internen Schnittstellen sollte das gleiche Bandenmuster ergeben wie der Verdau des eingesetzten Templates. Es wurden das mittels PCR hergestellte Template (Renilla), das NASBA-Produkt (Primer 441/442) von diesem Template und die Über-PCR (Primer 887/888) dieses NASBA-Produkts jeweils mit dem Enzym BspHI bzw. Earl verdaut. Als Über-PCR (siehe Kapitel 2.3.6) wurde eine PCR bezeichnet, bei der die Primer spezifisch an die, mittels NASBA-Primern in das NASBA-Produkt eingebrachten, 5'-Enden hybridisieren und damit spezifisch nur das NASBA-Produkt und nicht das Template amplifizieren. Das Template zeigte das für das jeweilige Restriktionsenzym spezifische Bandenmuster (Abb. 20, Spuren 1 – 3). Das NASBA-Produkt wurde weder von BspHI, noch von Earl geschnitten (Abb. 20, Spuren 4 – 6). Die Über-PCR über das NASBA-Produkt zeigte wieder das für jedes Enzym spezifische Bandenmuster (Abb. 20, Spuren 7 – 8). Es ist wahrscheinlich, dass das NASBA-Produkt hauptsächlich aus einem Erststrang mit partiell synthetisiertem Zweitstrang besteht, durchbrochen von nicht-abgebauten RNA-Fragmenten. Eine Schmelzkurvenanalyse bestätigte die heterogene Zusammensetzung des NASBA-Produkts im Vergleich zum Template (Daten nicht gezeigt). Auch eine separate Zweitstrangsynthese des NASBA-Produkts mit der *E. coli* DNA Polymerase I war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

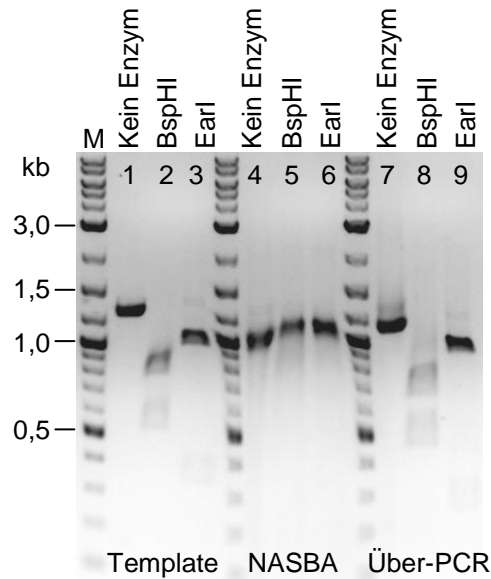


Abb. 20: Analyse des NASBA-Produkts mittels Restriktionsverdau

Jeweils 200 ng Template, NASBA-Produkt bzw. Über-PCR wurden mit BspHI bzw. EarI für 1,5 h bei 37°C verdaut und in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. Ausgehend vom Template sollte der Verdau mit BspHI ein 765 bp und ein 540 bp großes DNA-Fragment ergeben (Spuren 2, 5, 8). Der Verdau mit EarI sollte ein 945 bp und ein 355 bp großes DNA-Fragment ergeben (Spuren 3, 6, 9). In den Spuren 1, 4 und 7 wurden jeweils 200 ng der unverdauten Probe als Kontrolle aufgetragen. M: Größenstandard.

3.1.13 Zusammenfassung

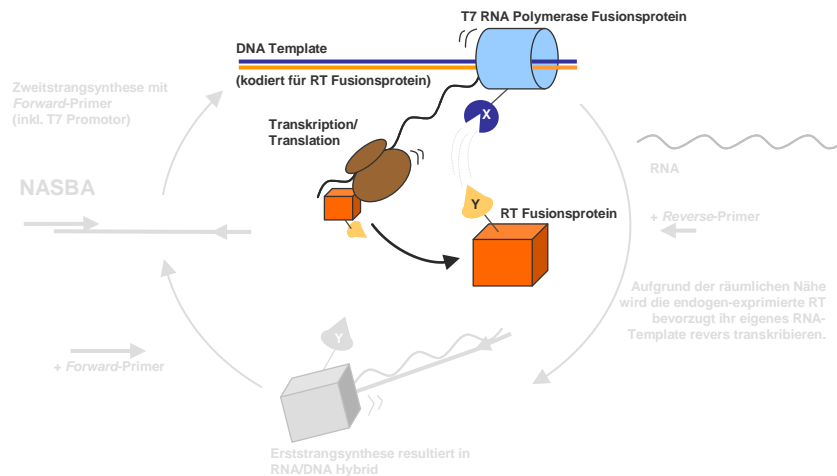
Die NASBA funktioniert:

- * ohne exogene RNase H, da die MMuLV RT ausreichend intrinsische RNase H-Aktivität besitzt
- * mit DNA-Templates bis zu einer Länge von 3,2 kb
- * bei einer Inkubationstemperatur von 37°C
- * ohne DMSO, dafür mit 0,5 M Betain

Der ineffiziente Einbau des *Forward*-Primers limitiert die Amplifikationsrate der NASBA.

Das NASBA-Produkt ist kein DNA-Doppelstrang, sondern möglicherweise ein DNA/RNA-DNA-Hybrid.

3.2 T7 RNA Polymerase und deren Fusionsproteine



Mit der T7 RNA Polymerase (T7 RNAP) können DNA-Templates in RNA-Moleküle transkribiert werden. Im Evolutionssystem soll die T7 RNAP in Fusion mit einem Bindepartner die räumliche Nähe höher affiner Bindepartner zur replizierenden Reversen Transkriptase ermöglichen.

Für die Klonierung der T7 RNAP wurde die entsprechende Gen-Sequenz mit einem N-terminalen Glycin-Serin-Linker (GS-Linker) bei der GENEART AG für die Expression in *E. coli* optimiert und synthetisiert. Die Aufreinigung von Proteinen aus Zelllysaten kann je nach verwendetem Affinitäts-Tag zu wesentlichen Unterschieden in Ausbeute und Reinheit des Zielproteins führen (Lichty *et al.*, 2005). Da die C-terminale Fusion von Affinitäts-Tags zur Inaktivierung der T7 RNAP führte (Daten nicht gezeigt), wurden drei verschiedene Affinitäts-Tags an den N-Terminus der T7 RNAP angefügt. Ein T7 RNAP-Konstrukt mit N-terminalem His-Tag wurde mittels PCR (Primer 804/281) generiert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI/NotI in den Vektor pEG-His1 kloniert (pEVHis). Für das Anfügen des HN-Tags (HNHNHNHNHNHN, Clontech) wurden die Primer 1030/1031 im PCR-Cycler für 5 min bei 95°C denaturiert und mittels Temperaturgradienten (Δ 10°C je 10 min) hybridisiert. Es folgte die Klonierung über die Restriktionsschnittstellen NdeI/KpnI in das Vektorgerüst pEV (pEVHN). Analog wurde der HAT-Tag (KDHLIHNHVHKEEHAHANK, Clontech) mit den Primern 1033/1034 N-terminal an die T7 RNAP fusioniert (pEVHAT).

3.2.1 Expression und Aufreinigung der T7 RNA Polymerase

Für die Expression und Aufreinigung der T7 RNA Polymerase wurden die Konstrukte pEVHis, pEVHN und pEVHAT jeweils in *E. coli* BL21-Zellen transformiert und aufgereinigt. Da die Aufreinigung über den HN-Tag die größte Menge an löslicher und reiner T7 RNAP ergab (Abb. 21 A), wurde für die folgenden Konstruktionen der T7 RNAP-Fusionsproteine das Vektorgerüst pEVHN verwendet. Dieser Vektor ermöglichte universell die N-terminale Fusion von Bindepartnern (Protein X) an die T7 RNAP über das Klonieren der kodierenden Sequenz mit den Schnittstellen KpnI/SacI (Abb. 21 B).

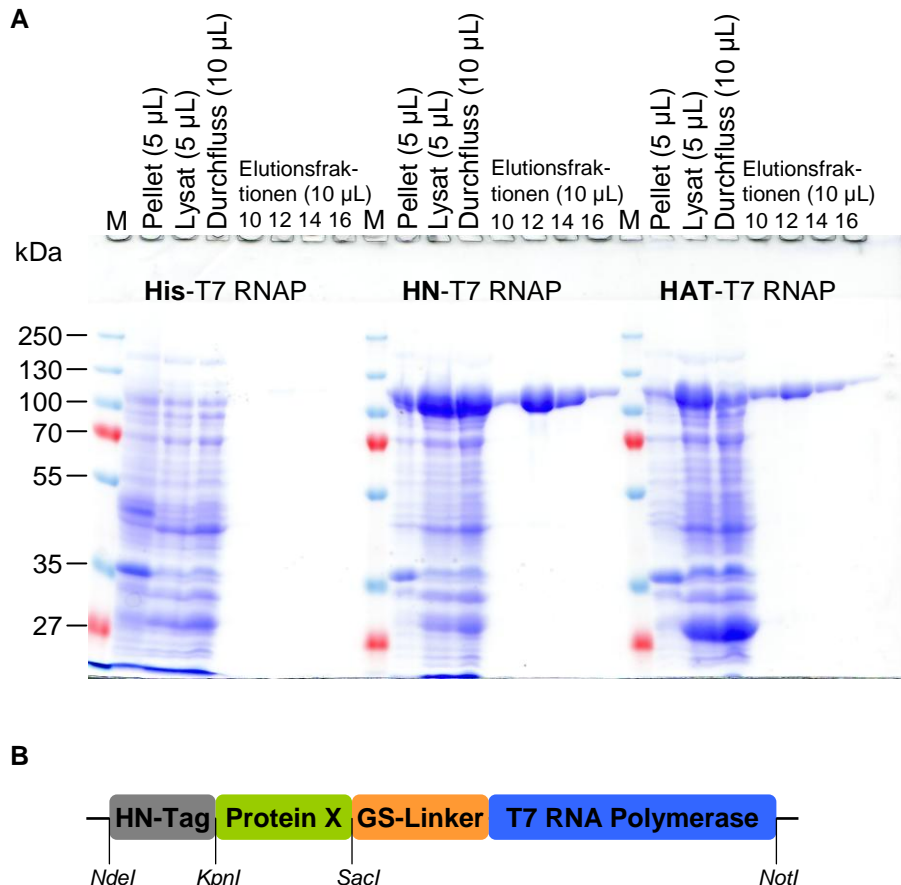


Abb. 21: Aufreinigung der T7 RNAP mit verschiedenen Affinitäts-Tags

(A) T7 RNAP-Konstrukte mit verschiedenen Affinitäts-Tags wurden in *E. coli* BL21-Zellen transformiert, ein jeweils korrekter Klon in 50 mL LB-Medium angezogen, die Expression mittels Zugabe von 1 mM IPTG induziert, die *E. coli* Kulturen mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Lysate an der FPLC-Anlage (ÄKTApurifier) mit einer HisTALON-Affinitätssäule aufgereinigt. Aliquots (Mengen wie angegeben) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. M: Größenstandard. (B) Ausschnitt aus dem Vektor pEVHN zur Klonierung und Aufreinigung der T7 RNAP-Fusionen mittels HN-Tag. Die komplette Vektorkarte befindet sich im Anhang (siehe Abb. 50).

3.2.2 T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine

Das *in vitro* Evolutionssystem soll der Verbesserung der Affinitäten zweier Bindepartner zueinander dienen. Als Test-Interaktionspaar sollten die SH3 Domäne Yes1 und ihr Bindepartner Sam68 fungieren. Die Fusion des 68 kDa großen Sam68 an die T7 RNAP führte zu einer reduzierten Expression des Fusionsproteins gegenüber der nativen T7 RNAP (Daten nicht gezeigt). Asbach (2009) identifizierte die 20 Aminosäuren lange Peptidsequenz des Sam68 Proteins, die bereits für eine Bindung an das Yes1 Protein ausreicht (P5, AGIQRIPLPPPPAPETYEY). Die kodierende Sequenz für das Peptid wurde in Form von Oligonukleotiden synthetisiert (1138/1139) und über die Restriktionsenzyme KpnI/SacI in das Vektorgerüst pEVHN kloniert (pEVHN-P5). Analog wurde die kodierende Sequenz des Yes1-nicht bindenden Peptids (P1, ASPATQPPPLLPPSATGPD) mittels Oligonukleotiden (1140/1141) in das Plasmid pEVHN kloniert (pEVHN-P1), um als Negativkontrolle zu fungieren.

3.2.3 Expression und Aufreinigung der T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine

Für die Expression der T7 RNAP-Fusionsproteine wurden die Plasmide pEVHN-P5 und pEVHN-P1 jeweils in *E. coli* BL21-Zellen exprimiert und die Proteine über die FPLC-Anlage (ÄKTApurifier) mit einer HisTALON-Affinitätssäule aufgereinigt. Elutionsfraktionen, die die T7 RNAP-Fusionsproteine enthielten, wurden mittels HiTrap™-Entsalzungssäule (GE Healthcare) in T7 RNAP-Lagerpuffer mit 50% Glycerin überführt. Beide Fusionsproteine konnten in hohem Reinheitsgrad gewonnen werden (Abb. 22). Die Elutionsfraktion 2 enthielt jeweils die größte Proteinmenge und wurde in allen weiteren Versuchen verwendet.

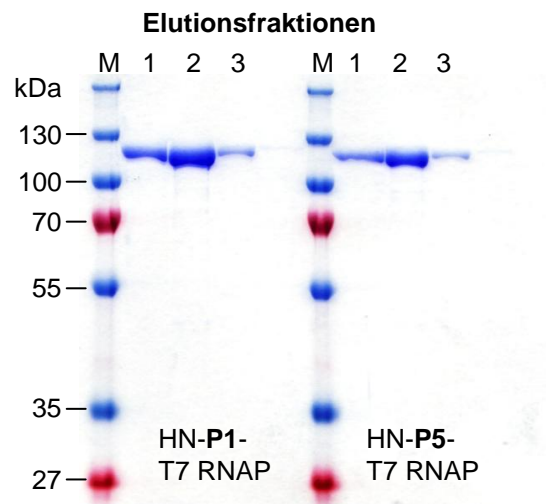


Abb. 22: Aufreinigung der T7 RNAP-Fusionsproteine

T7 RNAP-Fusionskonstrukte wurden in *E. coli* BL21-Zellen transformiert, ein jeweils korrekter Klon in 50 mL LB-Medium angezogen, die Expression mittels Zugabe von 1 mM IPTG induziert, die *E. coli* Kultur mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat an der FPLC-Anlage (ÄKTApurifier) mit einer HisTALON-Affinitätssäule aufgereinigt. Elutionsfraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden gepoolt und mittels HiTrap™-Entsalzungssäule an der ÄKTApurifier (GE Healthcare) in T7 RNAP-Lagerpuffer umgepuffert. Aliquots (10 µL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. M: Größenstandard.

3.2.4 Aktivitätstests der T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine

Zur Bestimmung der Aktivitäten der aufgereinigten HN-P1- bzw. HN-P5-T7 RNAP-Fusionsproteine wurden diese in *in vitro* Transkriptionen, mit einem zum Template komplementärem *Molecular Beacon* (MB_Renilla, 44), eingesetzt und im *real-time* *Cycler* vermessen. Der *Molecular Beacon* ist eine kurze Nukleotidsequenz, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Farbstoff (FAM) und am 3'-Ende den passenden Quencher (BHQ) aufweist. Ohne die Bindung an eine passende Ribonukleotidsequenz ist keine Fluoreszenz detektierbar. Bindet der *Molecular Beacon* an die in der Reaktion entstehende RNA kann der Farbstoff ungehindert fluoreszieren. Das detektierte Signal ist direkt proportional zur RNA-Menge. Als Kontrollansätze wurden *in vitro* Transkriptionen mit der T7 RNAP (NEB) und ohne T7 RNAP inkubiert. Beide T7 RNAP-Fusionsproteine (orange bzw. blaue Kurve) zeigten eine deutliche Aktivität (Abb. 23).

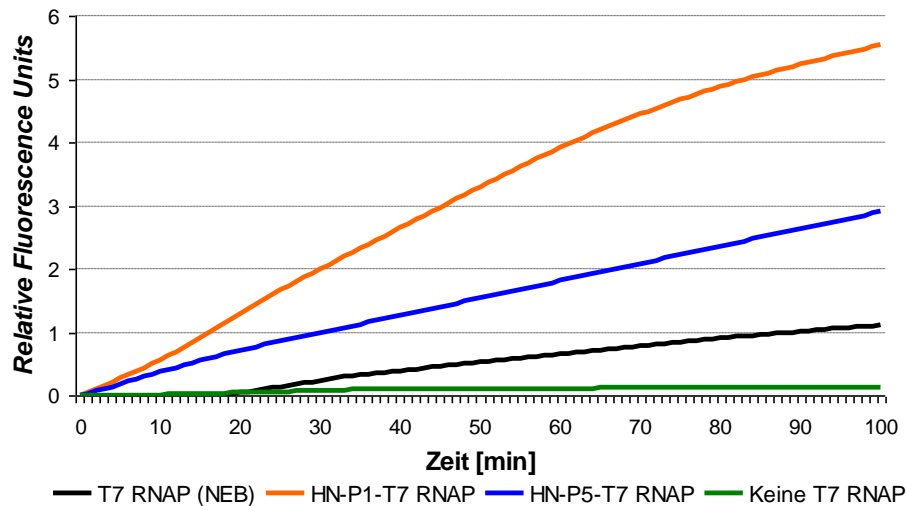


Abb. 23: *In vitro* Transkription mit den T7 RNAP-Fusionsproteinen

In vitro Transkriptionen mit 10 ng/μL Template (Renilla), 0,4 μM *Molecular Beacon* (44) und 0,2 μL der angegebenen T7 RNAP wurden für 100 min bei 37°C im *real-time* *Cycler* vermessen.

Anhand der eingesetzten Proteinmenge und der maximal erreichten *Relative fluorescence unit* (RFU) wurden die spezifischen Aktivitäten der T7 RNAP-Fusionsproteine berechnet. Die HN-P1-T7 RNAP hatte eine 3,2-fach, die HN-P5-T7 RNAP eine 2,9-fach höhere spezifische Aktivität im Vergleich zur Kontroll-T7 RNAP (NEB) (Tab. 2). Die N-terminalen Fusionspartner hatten keinen negativen Effekt auf die Aktivität der T7 RNA Polymerase.

Tab. 2: Spezifische Aktivitäten der T7 RNAP-Fusionsproteine

Protein	Proteinkonz. (mg/mL)	RFU _{max}	μg Protein eingesetzt	spezifische Aktivität (RFU _{max} /μg Protein)
HN-P1-T7 RNAP	0,24	5,54	0,048	115,4
HN-P5-T7 RNAP	0,14	2,88	0,028	102,9
T7 RNAP (NEB)	0,16	1,15	0,032	35,9

Weiterhin wurde die Aktivität in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions/Translationssystem untersucht. Dazu wurde das PURE Δ T7 RNA Polymerase System (PGI), das keine T7 RNA Polymerase enthält, jeweils mit einem der beiden T7 RNAP-Fusionsproteine supplementiert. Bei der Expression der MMuLV RT waren beide T7 RNAP-Fusionsproteine deutlich aktiv (Abb. 24).

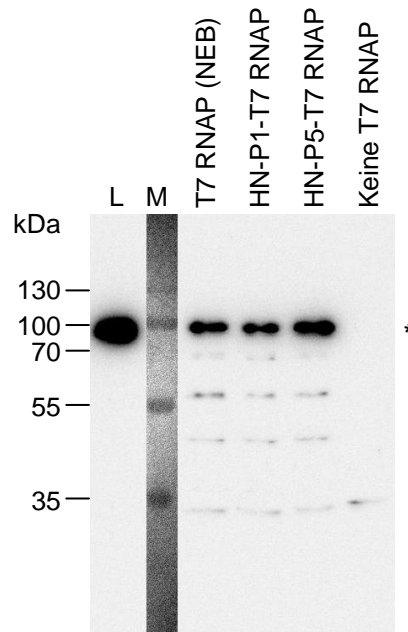


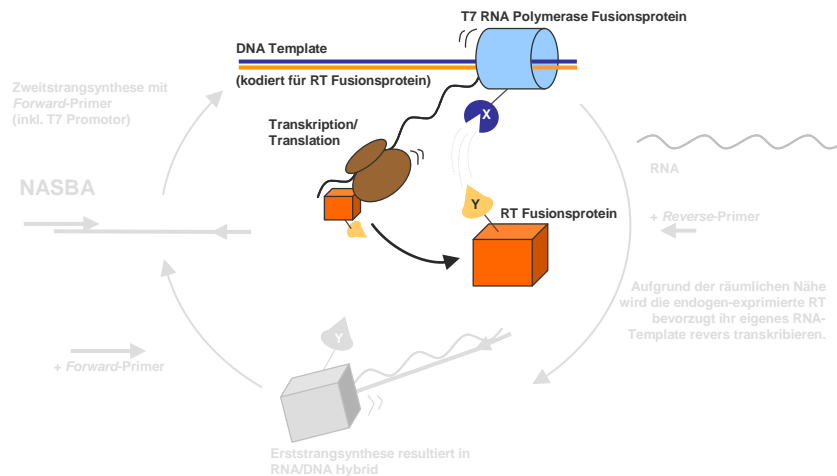
Abb. 24: *In vitro* Transkription/Translation mit den T7 RNAP-Fusionsproteinen und dem PURE Δ T7 RNAP System

In vitro Proteinexpressionen mit dem PURE Δ T7 RNAP System (70%), 18 ng/ μ L Template (MMuLV RT) und 10 ng/ μ L der angegebenen T7 RNA Polymerase wurden für 6 h bei 37°C inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2, Ziege-anti-Maus-HRP. L: MMuLV RT exprimierendes *E. coli* Lysat (2 μ L). M: Größenstandard.

3.2.5 Zusammenfassung

- * Expression und Aufreinigung aktiver T7 RNA Polymerase
- * C-terminale Fusionen führen zur Inaktivierung der T7 RNA Polymerase
- * N-terminale Fusionen von 20 Aminosäure-großen Bindepartnern haben keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der T7 RNA Polymerase

3.3 *Moloney murine leukaemia virus* Reverse Transkriptase



Die kodierende Sequenz der *Moloney murine leukaemia virus* Reversen Transkriptase (MMuLV RT) wurde bei der GENEART AG für die Expression in *E. coli* optimiert (*codon adaptation index*, CAI = 0,97, GC-Gehalt: 57,5%) und mit einem N-terminalen Glycin-Serin-Linker synthetisiert. Das synthetische Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen Sall/NotI in das Vektorgerüst pSc kloniert (pSc-MMuLV RT_GC). Aufgrund des hohen GC-Gehaltes könnten Sekundärstrukturen entstehen, die bei der Amplifikation während der NASBA stören würden. Deshalb wurde eine weitere MMuLV RT mit einem optimierten GC-Gehalt von 46% (CAI = 0,8) bei der GENEART AG synthetisiert und analog kloniert (pSc-MMuLV RT).

3.3.1 Vergleich von verschiedenen optimierten MMuLV RTs

Die verschieden optimierten Gensequenzen der MMuLV RTs sollten hinsichtlich ihrer Amplifikationsrate in der NASBA und ihrer Ausbeute in der *in vitro* Proteinexpression miteinander verglichen werden. Neben dem GC-Gehalt des gesamten Gens sollte vor allem der GC-Gehalt der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) und die damit verbundene Sekundärstruktur der mRNA einen starken Einfluss auf die Translationseffizienz in *E. coli in vitro* Expressionssystemen haben (Voges *et al.*, 2004). Der GC-Gehalt der 5'-UTR der GC-reichen MMuLV RT_GC betrug 54%, der der GC-armen MMuLV RT 51%. In der NASBA zeigte das GC-reiche Template (MMuLV RT_GC) eine geringere Amplifikationsrate als das GC-arme Template (MMuLV RT) (Abb. 25 A).

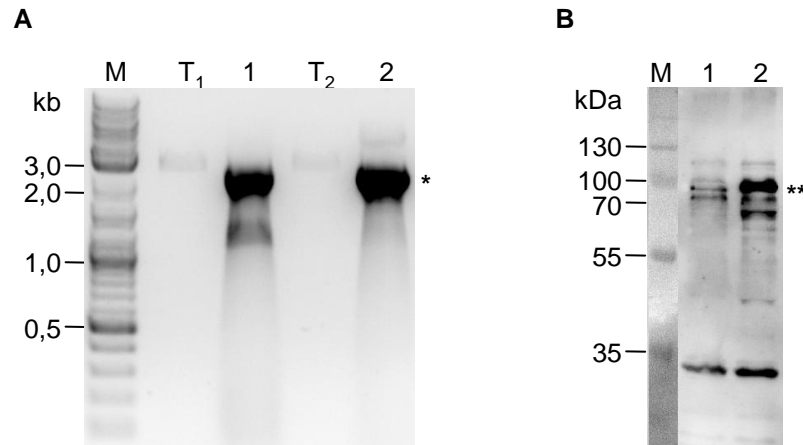


Abb. 25: Vergleich von verschiedenen optimierten MMuLV RTs

(A) NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,2 μ M je Primer (634/442) und 5 ng/ μ L Template (MMuLV RT_GC bzw. MMuLV RT) wurden für 5 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (2 μ L) in RNase A-haltigem Ladebuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. 10 ng Template MMuLV RT_GC (T₁). NASBA-Produkt MMuLV RT_GC (Spur 1). 10 ng Template MMuLV RT (T₂). NASBA-Produkt MMuLV RT (Spur 2). M: Größenstandard.

(B) *In vitro* Proteinexpressionen mit dem PURE System (70%) und 18 ng/ μ L Template (MMuLV RT_GC/MMuLV RT) wurden für 8 h bei 37°C inkubiert, Aliquots (5 μ L) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT (**) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Kaninchen-anti-MMuLV RT-Serum, Ziege-anti-Kaninchen-HRP. MMuLV RT_GC (Spur 1) und MMuLV RT (Spur 2). M: Größenstandard.

Mit dem MMuLV RT_GC-Template wurden neben dem Volllängen-NASBA-Produkt (*) auch kürzere DNA-Fragmente (1,2 – 2,3 Kb) amplifiziert. Die Proteinexpression der GC-reichen MMuLV RT_GC mit dem PURE System fiel deutlich geringer aus als die Expression der MMuLV RT (Abb. 25 B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Versuche mit dem GC-armen MMuLV RT-Template durchgeführt.

3.3.2 MMuLV RT als Fusionsprotein

Der Bindepartner Yes1, der im Rahmen des *in vitro* Evolutionssystems evolviert werden soll, soll als N-terminale Fusion an der MMuLV RT vorliegen. Neben der Sam68 bindenden Variante (Yes1wt) wurde von Kellner (2007) eine Yes1-Variante mittels Phagen-*Display* isoliert, die eine 67-fach höhere Affinität zum Sam68 aufweist (Yes1mut). Beide Yes1-Varianten wurden ausgehend von den Plasmiden pJH-Yes1wt bzw. pJH-Yes1mut, jeweils als PCR-Produkt amplifiziert (Primer 811/812) und über die Restriktionsschnittstelle EcoRI in das Vektorgerüst pSc-MMuLV RT kloniert. Die Konstrukte pSc-Yes1wt-MMuLV RT und pSc-Yes1mut-MMuLV RT wurden in der NASBA und der *in vitro* Proteinsynthese miteinander verglichen. In der NASBA zeigten beide Yes1-MMuLV RT-Templates eine im Vergleich zum MMuLV RT-Template ähnliche Amplifikationsrate (Abb. 26 A). Beide Yes1-MMuLV RT Proteine exprimierten mit dem PURE System, wobei die Yes1wt-MMuLV RT schwächer exprimiert wurde als die Yes1mut-MMuLV RT (Abb. 26 B).

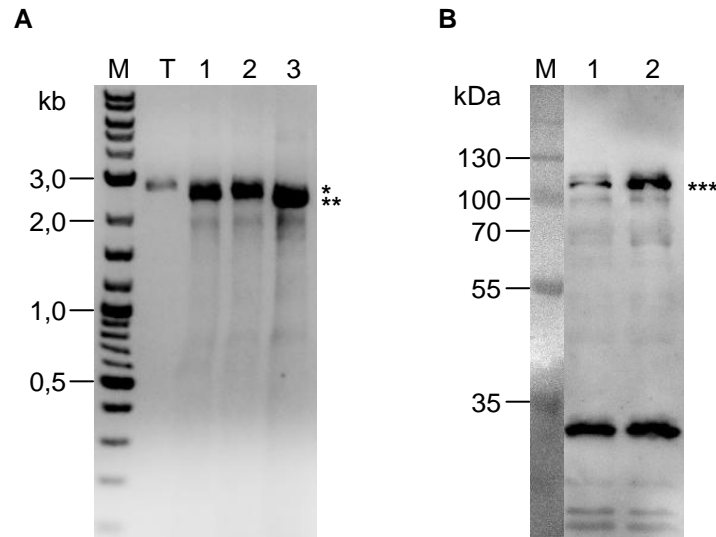


Abb. 26: Vergleich der MMuLV RT-Fusionskonstrukte

(A) NASBA Reaktionen ohne DMSO, mit 0,2 μM je Primer (634/442) und 5 ng/ μL Template wurden für 5 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (2 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. NASBA-Produkt Yes1wt-MMuLV RT (Spur 1, *), NASBA-Produkt Yes1mut-MMuLV RT (Spur 2, *), NASBA-Produkt MMuLV RT (Spur 3, **). T: 10 ng Template (Yes1mut-MMuLV RT).

(B) *In vitro* Proteinexpressionen mit dem PURE System (70%) und 18 ng/ μL Template (Yes1wt-MMuLV RT/Yes1mut-MMuLV RT) wurden für 8 h bei 37°C inkubiert, Aliquots (5 μL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Yes1wt-MMuLV RT (Spur 1) bzw. die Yes1mut-MMuLV RT (Spur 2) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Beide Proteine waren 85 kDa (***) groß. Nachweissystem: Kaninchen-anti-MMuLV RT-Serum, Ziege-anti-Kaninchen-HRP. M: Größenstandard.

3.3.3 Aktivitätstest der MMuLV RT-Fusionsproteine

Zur Bestimmung der Aktivitäten der mit dem PURE System exprimierten MMuLV RT-Fusionsproteine wurde das *RetroSys C-type Reverse Transcriptase Activity Kit* (Innovagen) verwendet. Der Aktivitätstest basiert auf dem Einbau Bromid-markierter dUTPs während einer cDNA-Zweitstrangsynthese, der Quantifizierung eingebauter dUTPs mittels AP-konjugiertem Antikörper und einer Farbreaktion, die dann als Maß für die Aktivität der Reversen Transkriptase dient.

Für den Aktivitätstest wurden die mit dem PURE System exprimierten MMuLV RT-Fusionsproteine ohne vorherige Aufreinigung in den entsprechenden, in Vorversuchen ermittelten, Verdünnungen eingesetzt. Die MMuLV RT (NEB) diente als Positivkontrolle, das mit dem PURE System exprimierte Renilla Protein als Negativkontrolle. Verglichen wurden die Aktivitäten der MMuLV RT-Fusionsproteine mit der MMuLV RT ohne Fusion. Alle MMuLV RT-Proteine waren deutlich aktiv und zeigten eine höhere Aktivität im Vergleich zur MMuLV RT (NEB) (Abb. 27). Die MMuLV RT-Fusionsproteine waren um den Faktor 2,3 bzw. 3,5 weniger aktiv als die MMuLV RT ohne Fusion, die N-terminale Fusion hatte also nur einen geringen negativen Einfluss auf die Aktivität der MMuLV RT. Die absoluten Werte der im PURE System exprimierten MMuLV RTs betrugen $1,0 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ MMuLV RT, $0,6 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Yes1mut-MMuLV RT und $0,2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ Yes1wt-MMuLV RT.

Verglichen mit der standardmäßig in eine NASBA eingesetzten Menge an MMuLV RT (NEB) von $6,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, entsteht deutlich weniger Protein als benötigt. Die geringen Proteinmengen können teilweise durch die erhöhte relative Aktivität gegenüber der MMuLV RT (NEB) ausgeglichen werden (Abb. 27).

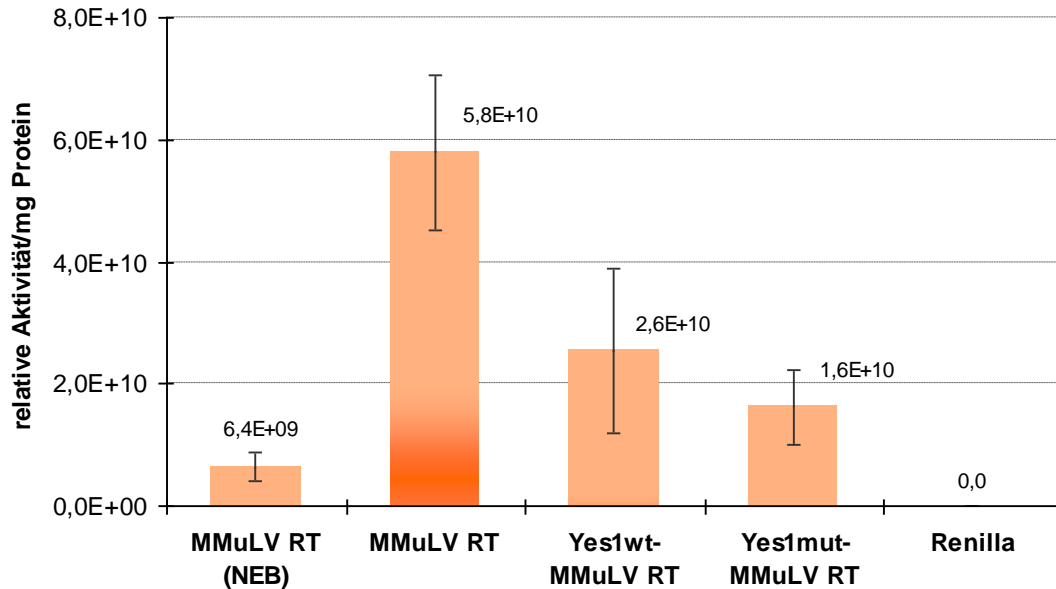


Abb. 27: Aktivitätstest der MMuLV RT-Fusionsproteine

Mit dem PURE System exprimierte MMuLV RT-Fusionproteine wurden unaufgereinigt in das *RetroSys C-type Reverse Transcriptase Activity Kit* eingesetzt. Anhand eines Western Blots mit Immunfärbung wurden die eingesetzten Proteinmengen abgeschätzt. Die Aktivitäten wurden um den Wert des Ansatzes mit exprimierter Renilla korrigiert. Aus drei parallelen Messungen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen ermittelt.

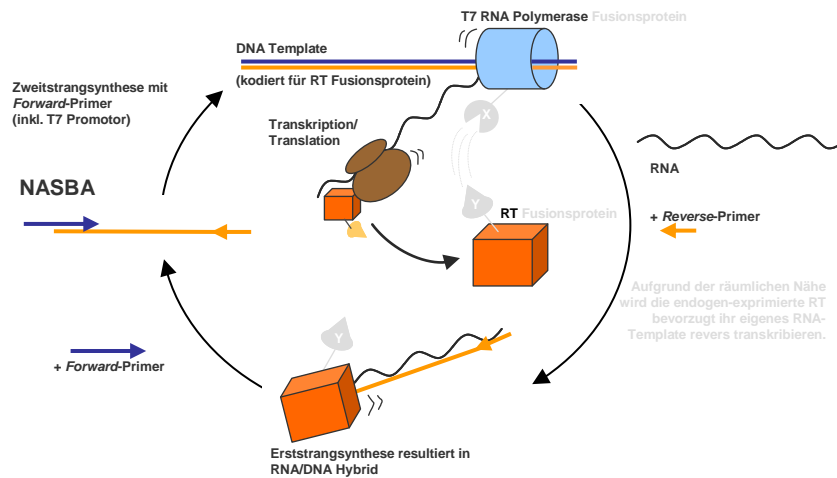
Da die NASBA auch mit einem Zehntel der standardmäßig eingesetzten Menge an MMuLV RT (NEB) funktionierte (Daten nicht gezeigt), sollten die endogen im PURE System exprimierten MMuLV RTs und ihre entsprechenden Aktivitäten ausreichen, um im zu etablierenden Evolutionssystem die DNA-Amplifikation mittels NASBA zu ermöglichen.

3.3.4 Zusammenfassung

* das MMuLV RT-Gen mit einem GC-Gehalt von 46% amplifiziert bzw. exprimiert stärker in der NASBA bzw. im PURE System als die MMuLV RT-Variante mit 57,5% GC-Gehalt

* MMuLV RT-Fusionskonstrukte besitzen im *RetroSys C-type Reverse Transcriptase Activity Kit* eine leicht reduzierte Aktivität gegenüber der nativen MMuLV RT

3.4 Kombination NASBA und *in vitro* Proteinsynthese



Das zu etablierende *in vitro* Evolutionssystem stellt eine Kombination aus NASBA und *in vitro* Proteinsynthese dar. Für die *in vitro* Proteinsynthese sollte bevorzugt ein *E. coli* Lysat verwendet werden, da die Effizienz von prokaryotischen im Vergleich zu eukaryotischen Expressionssystemen (Weizenkeim bzw. Kaninchen Retikulozyten Lysat) höher ist (Hino *et al.*, 2008). Vorversuche zeigten, dass *E. coli* Lysate die NASBA inhibierten (Daten nicht gezeigt). Daher wurden zunächst verschiedene *in vitro* Proteinsynthesysteme bzw. -Lysate auf ihre Kompatibilität mit der NASBA überprüft, indem diese mit einem Anteil von 20% in die NASBA eingesetzt wurden. NASBA Reaktionen mit PURE System, Weizenkeim Extrakt bzw. Kaninchen Retikulozyten Lysat zeigten, ebenso wie die Positivkontrolle mit H₂O, ein deutliches DNA-Amplifikationssignal (Abb. 28). NASBA Reaktionen mit *E. coli* Lysaten ergaben kein NASBA-Produkt.

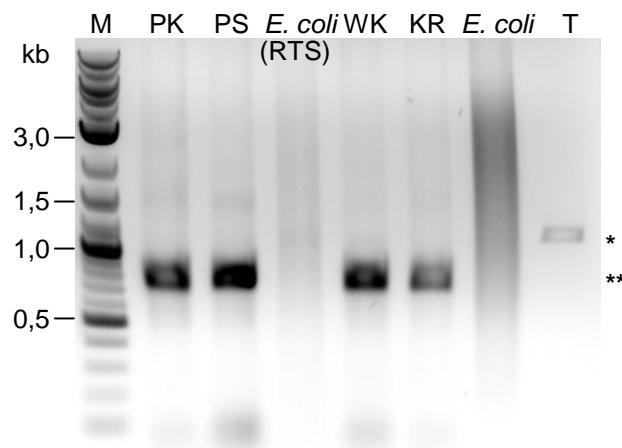


Abb. 28: Bestimmung eines *in vitro* Proteinsynthesystems bzw. -Lysats zur Kombination mit der NASBA

NASBA Reaktionen wurden mit 10% DMSO, 5 ng/μL Template (GFP), 0,2 μM je Primer (510/316) und 20% des angegebenen *in vitro* Proteinsynthesystems bzw. -Lysats für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt, in 20 μL EB-Puffer aufgenommen und Aliquots (6 μL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. PK: Positivkontrolle, PS: PURE System, *E. coli* (RTS): *E. coli* Lysat des RTS 100 HY Kits (Roche), WK: Weizenkeim Extrakt, KR: Kaninchen Retikulozyten Lysat, *E. coli*: *E. coli* Lysat, T: 30 ng GFP Template (*). NASBA-Produkt (**). M: Größenstandard.

Das PURE System wurde das *in vitro* Proteinsynthesystem der Wahl und die Reaktionsbedingungen der NASBA sollten im weiteren Verlauf mit denen des PURE Systems aufeinander abgestimmt werden, um beide Reaktionen zeitgleich und jeweils möglichst optimal ablaufen zu lassen.

3.4.1 Inhibierung der NASBA durch *E. coli* Lysat

Wie in Kapitel 3.4 gezeigt, führte eine 20%ige Zugabe von *E. coli* Lysat zu einer NASBA zu deren kompletter Inhibierung. Das *E. coli* Lysat inhibiert die NASBA wahrscheinlich aufgrund von *E. coli* spezifischen Nukleasen, die das Template oder NASBA-Produkt abbauen, durch *E. coli* eigene DNA-Polymerasen, die die MMuLV RT inhibieren, oder durch andere im Lysat enthaltene Komponenten. Die Zugabe von *E. coli* Lysat zur NASBA in Endkonzentrationen von 0,001 – 10% zeigte, dass die Inhibierung der NASBA durch *E. coli* Lysat ein titrierbarer Effekt war (Abb. 29). Unter einer Lysat-Konzentration von 0,1% wurde die NASBA nicht mehr inhibiert (Abb. 29, Spur 3). Da hitzeinaktiviertes *E. coli* Lysat in einer Endkonzentration von 10% die NASBA ebenfalls nicht mehr inhibierte (Abb. 29, Spur 6), wurde von einer thermosensitiven Lysat-Komponente als Inhibitor ausgegangen.

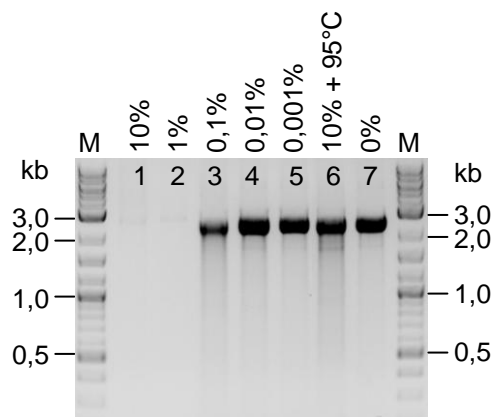


Abb. 29: Inhibierung der NASBA durch *E. coli* Lysat

NASBA Reaktionen mit 0,5 M Betain, 0,2 μ M je Primer (979/981), 5 ng/ μ L Template (MMuLV RT) und 0,001 – 10% *E. coli* Lysat (RTS, Roche) wurden für 5 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (2 μ L) in RNase A-haltigem Ladebuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. Die NASBA in Spur 6 enthält für 5 min bei 95°C inaktiviertes *E. coli* Lysat (RTS, Roche). M: Größenstandard.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der inhibierenden Komponente im *E. coli* Lysat, wurde eine Lysat-Fraktionierung mittels Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden die wasserlöslichen Bestandteile des *E. coli* Lysats (RTS, Roche) ihrem Molekulargewicht entsprechend mit einer Gelfiltrationssäule (Tosoh Bioscience) an einer FPLC-Anlage (ÄKTApurifier) aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen (je 0,5 mL) des *E. coli* Lysats wurden mit einer Endkonzentration von 10% in die NASBA eingesetzt. Die Fraktionen 16, 17 und 21 hemmten die NASBA, während die restlichen Fraktionen eine DNA-Amplifikation erlaubten (Abb. 30 B). Anhand der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE konnte kein Protein identifiziert werden, das charakteristisch für die inhibierenden Fraktionen war.

Möglicherweise ist die Proteinmenge zu gering um eine sichtbare Bande zu geben, oder das Protein wird von anderen Banden überlagert. Möglich wäre auch, dass es sich bei der Inhibierung um einen additiven Effekt mehrerer Komponenten handelt. Die nicht-inhibierenden Fraktionen wurden anschließend vereinigt und aufkonzentriert, zeigten aber keine Translationsaktivität mehr (Daten nicht gezeigt).

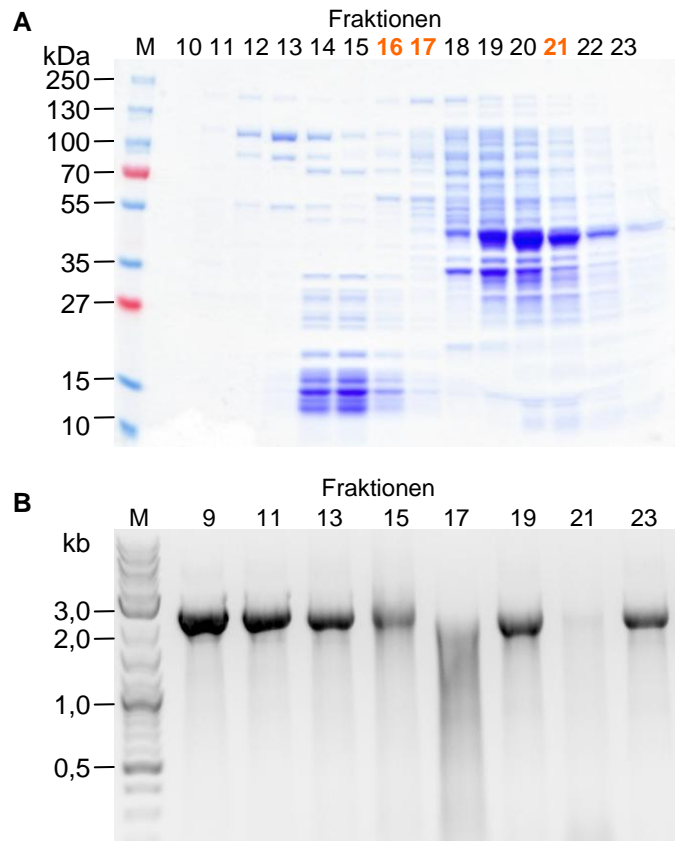


Abb. 30: Fraktionierung des *E. coli* Lysats mittels Gelfiltration

(A) Die Fraktionierung des *E. coli* Lysats (RTS, Roche) wurde mit einer TSKgel G4000PWxl-Gelfiltrationssäule (Tosoh Bioscience) an der FPLC-Anlage ÄKTApurifier (GE Healthcare) durchgeführt, Aliquots (10 µL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Orange Zahlen markieren NASBA-inhibierende Fraktionen. M: Größenstandard.

(B) NASBA Reaktionen mit 0,5 M Betain, 0,2 µM je Primer (979/981), 5 ng/µL Template (MMuLV RT) und jeweils 10% der angegebenen *E. coli* Lysat-Fraktion wurden für 5 h bei 37°C inkubiert und Aliquots (3 µL) in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. NASBA-Produkt (*). M: Größenstandard.

Da gezeigt wurde, dass die *E. coli* DNA Polymerase I bereits in pmol-Mengen inhibierend auf die MMuLV RT in einer RT-PCR wirken kann (Arezi & Hogrefe, 2007), wurden mittels Western Blot und Immunfärbung die *E. coli* Lysat-Fractionen auf das Vorhandensein von *E. coli* DNA Polymerase I untersucht. Die *E. coli* DNA Polymerase I konnte sowohl in den inhibierenden, als auch in den nicht-inhibierenden Fraktionen detektiert werden (Abb. 31), was einer inhibierenden Funktion im Lysat widerspricht. In Einklang zu diesem Ergebnis zeigte ein, über den spezifischen Antikörper DNA Polymerase I abgereichertes, Lysat weiterhin NASBA inhibierende Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die DNA Polymerase I konnte somit als inhibierende Komponente des *E. coli* Lysats ausgeschlossen werden.

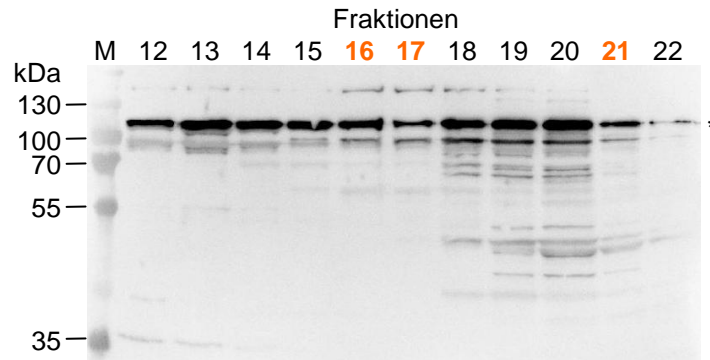


Abb. 31: Detektion der *E. coli* DNA Polymerase I

E. coli Lysat-Fractionen (10 µL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die *E. coli* DNA Polymerase I (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Orange Zahlen markieren NASBA-inhibierende Fraktionen. Nachweissystem: Kaninchen-anti-*E. coli* DNA Polymerase I-Serum, Ziege-anti-Kaninchen-HRP. M: Größenstandard.

Vorversuche zeigten, dass das RTS *E. coli* Lysat, trotz der Präparation aus einem Exonuklease-freien *E. coli* Stamm, Nukleaseaktivität besitzt. Dabei wurde mit RTS *E. coli* Lysat inkubiertes PCR-Produkt (MMuLV RT) innerhalb einer Stunde degradiert. Die Biotinylierung des PCR-Produkts, zur Stabilisierung gegenüber einem Nuklease-Verdau, konnte die Degradation nicht verhindern (Daten nicht gezeigt).

RNase E, eine essentielle Endonuklease in *E. coli*, ist am mRNA-Abbau als Teil eines Proteinkomplexes, dem sogenannten Degradosom, beteiligt (Grunberg-Manago, 1999; Lopez *et al.*, 1999). RNase E-defiziente *E. coli* Stämme weisen eine höhere mRNA-Stabilität auf und ergeben so eine höhere Ausbeute bei der Proteinexpression. Um zu untersuchen, ob die NASBA in einem RNase E-defizientem *E. coli* Lysat funktioniert, wurde das Lysat des RNase E-defizienten *E. coli* Stammes BL21 star (DE3) hergestellt und in einer Endkonzentration von 10% in die NASBA eingesetzt. Der NASBA Ansatz zeigte keine DNA-Amplifikation (Daten nicht gezeigt).

RNA/DNA-Hybride, die dem Abbau durch die intrinsische RNase H-Aktivität der MMuLV RT gegenüber resistent sind, können durch die *E. coli* eigene RNase HI degradiert werden. Dies führt zur Inhibierung der Reversen Transkription *in vitro* und resultiert in cDNA-Abbruchfragmenten (Ma & Crouch, 1996). Ein, aus einem RNase HI deletiertem *E. coli* Stamm, präpariertes Lysat inhibierte die NASBA ebenfalls (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde untersucht, ob Ribosomen als Teil des *E. coli* Lysats für die Inhibierung der NASBA verantwortlich sind. Die Zugabe von 1,2 µM Ribosomen, hergestellt nach der Methode von Kudlicki *et al.* (1992), inhibierte die NASBA. Die im PURE System enthaltenen Ribosomen wurden nach der Methode von Spedding (1990) präpariert und zeigten, wenn in einer Konzentration von 1,2 µM in die NASBA eingesetzt, keinen Inhibierungseffekt (Daten nicht gezeigt). Die Ribosomenfraktion nach Kudlicki enthält wahrscheinlich inhibierende Proteine, die noch mit den Ribosomen assoziiert sind, während bei der Ribosomenfraktion nach Spedding, diese Proteine durch den zusätzlichen Waschschrift mit Hochsalzpuffer entfernt wurden. Der Ribosomen-Präparation nach Kudlicki konnte Translationsaktivität nachgewiesen werden. Die Ribosomen nach Spedding, durch den Waschschrift komplett von anhaftenden

Translationskomponenten befreit, zeigten keine Translationsaktivität mehr (persönliche Korrespondenz Axel Freischmidt, AG Kalbitzer, Universität Regensburg).

3.4.2 Zusammensetzung von NASBA und PURE System

Die Kombination von NASBA und PURE System setzte voraus, dass Puffer, Salze, Enzyme und weitere Bestandteile in kongruenten Konzentrationen vorlagen. Eine Übersicht über die Zusammensetzung von NASBA und PURE System gibt Tab. 3. Da das PURE System als Zweikomponentensystem (Lösung A + B) angeboten wurde, und somit die Konzentrationen der einzelnen Komponenten nur begrenzt variabel waren, wurden die Reaktionsbedingungen der NASBA an die des PURE Systems angepasst. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die NASBA auch mit einem HEPES basierten Puffersystem, mit Magnesiumacetat und Kaliumglutamat anstelle von Magnesiumchlorid und Kaliumchlorid funktionierte (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3: Zusammensetzung von NASBA und PURE System

	NASBA	PURE System (Shimizu <i>et al.</i> , 2001)
Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,3)	50 mM HEPES KOH (pH 7,6)
Salze	70 mM KCl 12 mM MgCl ₂	100 mM KGlu 13 mM MgAc ₂
Nukleotide	2 mM je NTP 1 mM je dNTP	2 mM ATP, GTP, 1 mM CTP, UTP
Enzyme	1,6 U/μL T7 RNAP 0,325 U/μL MMuLV RT	10 μg/mL T7 RNAP 2 U/mL Pyrophosphatase 1,1 μg/mL Nukleosiddiphosphat Kinase 3,0 μg/mL Myokinase (Adenylat Kinase) 4,0 μg/mL Kreatin Kinase 4500 U/mL Methionyl-tRNA Formyltransferase 20 Aminoacyl-tRNA Synthetasen 10 Translationsfaktoren
Weitere Komponenten	5 mM DTT 0 – 15% DMSO 15 ng/μL DNA-Template 0,2 μM je Primer 0,25 – 0,5 M Betain	1 mM DTT 2 mM Spermidin 1 – 10 ng/μL DNA-Template 1,2 μM Ribosomen 20 mM Kreatin-Phosphat 0,3 mM Aminosäuren 10 mg/mL 10-Formyl-5,6,7,8 tetrahydrofolinsäure 56 A ₂₆₀ /mL tRNA Mix

3.4.3 Versuchs-Aufbau zur Kombination von NASBA und PURE System

Für die Kombination von NASBA und PURE System wurden die optimalen Konzentrationen der einzelnen Reaktionskomponenten ermittelt. Eine Übersicht über die konstant gehaltenen bzw. variierten Parameter ist in Tab. 4 enthalten.

Tab. 4: Versuchs-Aufbau zur Kombination von NASBA und PURE System

Konstante Parameter	Varierte Parameter	Bereich	siehe Kapitel
PURE System	Template-Konz.	5 – 40 ng/μL	3.4.4
PURE System	DMSO-Konz. Betain-Konz.	0 – 10 % 0 – 0,5 M	3.4.5
PURE System + 18 ng/μL Template + 0,375 M Betain + 0,325 U/μL MMuLV RT	dNTP-Konz. Primer-Konz. Zusätzl. T7 RNAP Zusätzl. NTPs	0,5 – 0,75 mM 0,2 – 0,40 μM +/- 1,6 U/μL +/- 0,5 mM	3.4.5
PURE System + 18 ng/μL Template + 0,325 U/μL MMuLV RT + 0,2 μM je Primer + 6 mM NTPs	dNTP-Konz. MgAc ₂	0,7 – 1,0 mM +/- 9,0 mM	3.4.6
PURE System + 18 ng/μL Template + 0,345 M Betain + 9 mM MgAc ₂	MMuLV RT Primer dNTPs	+/- 0,325 U/μL +/- 0,2 μM +/- 2,5 mM	3.4.7

3.4.4 Optimale Template-Konzentration im PURE System

Für eine effiziente DNA-Amplifikation in der NASBA wurde eine Template-Konzentration von 5 ng/μL ermittelt (siehe Kapitel 3.1.10). Zur Bestimmung der optimalen Template-Konzentration im PURE System wurde das MMuLV RT-Template, ausgehend von Konzentrationen zwischen 5 – 40 ng/μL, mit dem PURE System exprimiert. Die maximale Proteinexpression wurde mit einer Template-Konzentration von 10 ng/μL erreicht (Abb. 32, Spur 3). In den Ansätzen mit 5 bzw. 20 ng/μL Template wurde weniger MMuLV RT exprimiert, ab 40 ng/μL Template kam es zur Inhibierung der Proteinsynthese (Abb. 32, Spur 5).

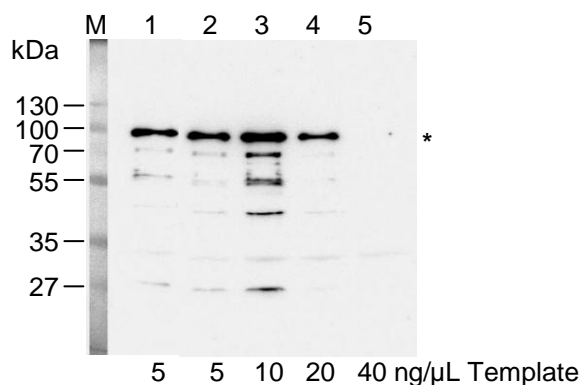


Abb. 32: Optimale Template-Konzentration für das PURE System

In vitro Proteinexpressionen mit dem PURE System (70%) und 5 – 40 ng/μL Template (MMuLV RT) wurden für 12 h bei 37°C inkubiert, Aliquots (5 μL) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2, Ziege-anti-Maus-HRP. Der Ansatz in Spur 1 enthielt Template, das zuvor aus einem Agarosegel mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* aufgereinigt wurde. Alle anderen Templates wurden standardmäßig mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt. M: Größenstandard.

Die Firma NEB empfiehlt für die Expression mit dem PURE System kein aus Agarosegel aufgereinigtes Template einzusetzen, da DNA-interkalierendes Ethidiumbromid als Translationsinhibitor wirken kann (siehe www.neb.com, FAQs For PURExpress). Dieser Effekt konnte nicht bestätigt werden, die Proteinexpression mit zuvor aus Agarosegel aufgereinigtem Template funktionierte vergleichbar zum aus Lösung aufgereinigten Template (vgl. Abb. 32, Spuren 1 + 2).

3.4.5 Einfluss von NASBA-Komponenten auf das PURE System

DMSO und Betain sind Sekundärstruktur-reduzierende Additive, die vor allem im Bereich der PCR, bei der Amplifikation von GC-reichen DNA-Sequenzen, verwendet werden (Varadaraj & Skinner, 1994; Henke *et al.*, 1997). Um den Einfluss von DMSO und Betain auf das PURE System zu untersuchen, wurde die MMuLV RT mit 0 – 10% DMSO bzw. 0,25 – 0,5 M Betain exprimiert. Die MMuLV RT besaß einen N-terminalen FLAG-Tag und konnte mit dem anti-FLAG-Antikörper detektiert werden. DMSO inhibierte bereits ab einer Konzentration von 5% die Proteinexpression (Abb. 33, Spur 2). Die Zugabe von 0,5 M bzw. 0,25 M Betain führte zu einer Verdopplung der Proteinexpression (Abb. 33, Spur 3 bzw. 4). Da Betain als Alternative zu DMSO in der NASBA zu einer 2 – 3-fachen Erhöhung der DNA-Amplifikation führte (siehe Kapitel 3.1.11), wurde in allen folgenden Versuchen Betain in einer Konzentration von 0,25 – 0,5 M eingesetzt.

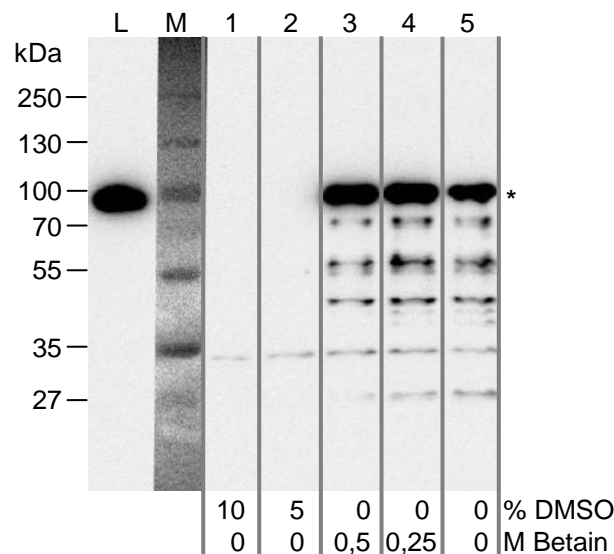


Abb. 33: Proteinexpression mit dem PURE System plus Sekundärstruktur-reduzierende Additive

In vitro Proteinexpressionen mit dem PURE System (70%), 18 ng/μL Template (MMuLV RT) und 0 – 10% DMSO bzw. 0,25 – 0,5 M Betain wurden für 8 h bei 37°C inkubiert. Aliquots (5 μL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2, Ziege-anti-Maus-HRP. M: Größenstandard.

Weitere essentielle NASBA Komponenten wurden auf ihren Einfluss im PURE System untersucht. Dazu wurde die MMuLV RT mit dem PURE System unter Zugabe von NTPs, Oligonukleotiden oder T7 RNAP exprimiert. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 0,5 mM je dNTP und 0,2 μM je Oligonukleotid zum PURE System keinen inhibitorischen Effekt auf die Proteinexpression hatte (Daten nicht gezeigt), dieser Ansatz diente

in diesem Versuch als Positivkontrolle (Abb. 34, Spur 1). Die in der NASBA verwendete Konzentration von 1,6 U/ μ L T7 RNAP, zusätzlich zur bereits im PURE System enthaltenen T7 RNAP, führte zu einer stark reduzierten Proteinexpression (Abb. 34, Spur 2). Ein Grund dafür könnte die achtfach höhere Transkriptionsrate der T7 RNAP im Vergleich zur Proteinsyntheserate der Ribosomen sein, die die Entkopplung der Transkription von der Translation verursacht und damit zu einer Anhäufung instabiler mRNAs im Reaktionsansatz führt (lost *et al.*, 1992). Die Zugabe von 0,5 mM je NTP, um die in einer NASBA essentielle Konzentration von 2 mM je NTP zu simulieren, inhibierte die Proteinexpression komplett (Abb. 34, Spur 3). Weiterhin enthält die NASBA optimalerweise 1 mM je dNTP, bereits 0,75 mM je dNTP hatten einen stark inhibierenden Effekt auf das PURE System (Abb. 34, Spur 4). Die Zugabe von 0,4 μ M je Primer zeigte ebenfalls einen leicht inhibitorischen Effekt auf die Proteinexpression (Abb. 34, Spur 5). Da die Zugabe von T7 RNAP und NTPs einen inhibitorischen Effekt auf das PURE System hatte und beide Komponenten im PURE System in Konzentrationen vorlagen, die zumindest eine funktionelle *in vitro* Transkription ermöglichten, wurde auf eine Konzentrationssteigerung dieser beiden Komponenten verzichtet. Es wurden weitere Versuche zur Optimierung der dNTP-Konzentration durchgeführt.

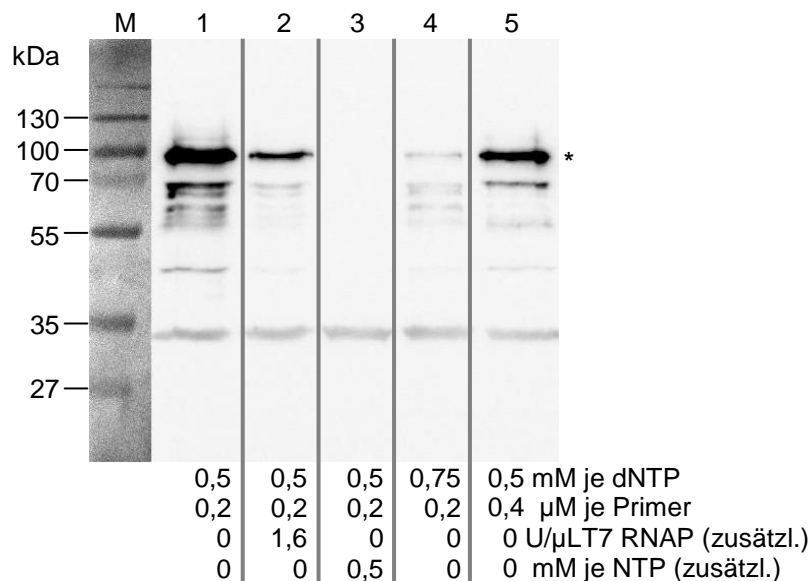


Abb. 34: PURE System mit NASBA Komponenten

In vitro Proteinexpressionen mit dem PURE System (70%), 18 ng/ μ L Template, 0,325 U/ μ L MMuLV RT (NEB), 0,375 M Betain und den NASBA Komponenten wie angegeben wurden für 16 h bei 37°C inkubiert, Aliquots (5 μ L) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2, Ziege-anti-Maus-HRP. M: Größenstandard.

3.4.6 Magnesiumionen- und dNTP-Konzentration

Salzkonzentrationen, speziell die Magnesium- und Kaliumkonzentrationen, haben einen großen Einfluss auf die *in vitro* Proteinsynthese in einem System mit gekoppelter Transkription und Translation (Wolfe & Weisberger, 1965; Craig *et al.*, 1992). Ein Teil der Magnesiumionen komplexiert mit ATP und wird für enzymatische Reaktionen benötigt (Saylor *et al.*, 1998). Das PURE System enthielt 13 mM Magnesiumacetat und 6 mM NTPs (gesamt), so dass ein Überschuss von 7 mM Magnesium bei der *in vitro* Proteinsynthese vorlag.

In der NASBA waren die Konzentrationen von Magnesium und Nukleotiden identisch (12 mM MgCl_2 , 8 mM NTPs, 4 mM dNTPs). Zur Ermittlung der, für beide Reaktionen, idealen Magnesium- und Nukleotidkonzentration wurde das Renilla Protein mit dem PURE System unter gleichzeitiger Zugabe von 0,7 – 1 mM je dNTP exprimiert und hinsichtlich der Proteinexpression und DNA-Amplifikation untersucht.

Bei der Kombination von NASBA und PURE System führte die Zugabe von 1 mM je dNTP (4 mM gesamt) zur kompletten Inhibierung der Proteinsynthese (siehe Abb. 35 A, Spur 4). Durch die Zugabe von zusätzlich 9 mM MgAc_2 (= 12 mM MgAc_2 Überschuss) konnte die Proteinexpression jedoch reaktiviert werden (Abb. 35 A, Spur 5).

Bei der NASBA konnte ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen DNA-Amplifikation und dNTP-Konzentration ermittelt werden (Abb. 35 B, Spuren 1 – 4). Die Zugabe von 1 mM je dNTP (4 mM gesamt) zeigte die stärkste Amplifikationsrate, in diesem Ansatz war der Mg^{2+} -Überschuss am geringsten (3 mM). Mit der Zugabe von 9 mM MgAc_2 stieg der Mg^{2+} -Überschuss auf 12 mM an und inhibierte die NASBA komplett (Abb. 35 B, Spur 5).

Die Kombination von NASBA und PURE System, supplementiert mit exogener MMuLV RT (NEB), funktionierte mit dem 1,0 kb großen Template (Renilla) mit dNTP-Konzentrationen zwischen 0,7 – 0,9 mM und einem dementsprechenden MgAc_2 -Überschuss von 3,4 – 4,2 mM.

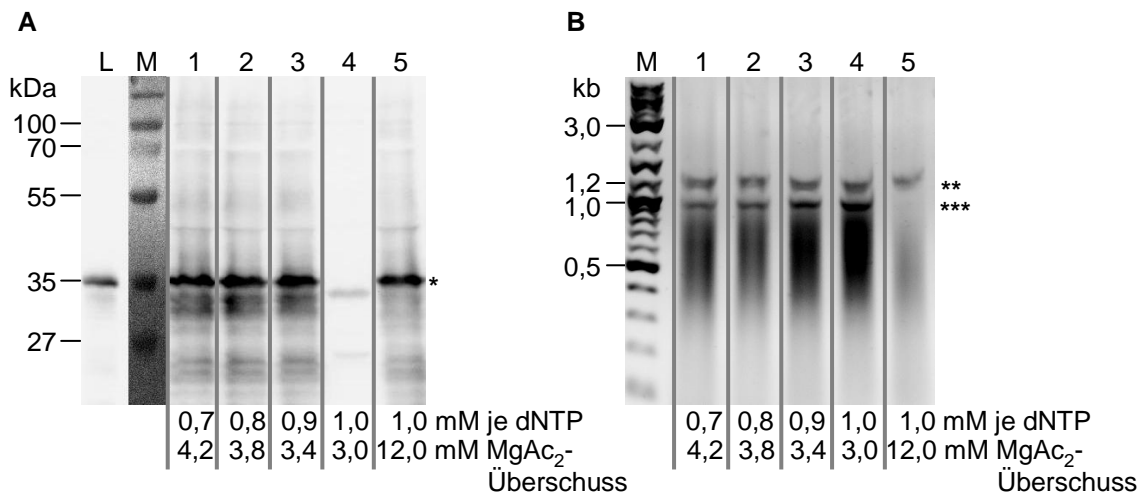


Abb. 35: Magnesium- und dNTP-Konzentration in der Kombination von NASBA und PURE

Kombinierte Ansätze mit dem PURE System (70%), 18 ng/ μL Template (Renilla), 0,325 U/ μL MMuLV RT (NEB), 0,2 μM je Primer (634/442), 0,7 – 1 mM je dNTP mit/ohne 9 mM MgAc_2 wurden für 16 h bei 37°C inkubiert. (A) Aliquots (3 μL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Renilla Protein (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-Renilla, Ziege-anti-Maus-HRP. L: 2 μL Renilla exprimierendes *E. coli* Lysat.

(B) Aliquots (8 μL) wurden mit 5 μg RNase A für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt, in 16 μL EB eluiert und 10 μL in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. Template (Renilla, **), NASBA-Produkt (***). M: Größenstandard.

3.4.7 Die endogen exprimierte MMuLV RT ist aktiv

Das selbstständig evolvierende System basiert auf der Aktivität einer endogen exprimierten MMuLV RT, die die NASBA antreibt.

Die in Kapitel 3.4.6 ermittelte Magnesiumionen- und dNTP-Konzentration für die Kombination aus NASBA und PURE System funktionierten für das 2,5 kb große MMuLV RT Template nicht (Daten nicht gezeigt). Mittels Erhöhung der dNTP-Konzentration in millimolaren Schritten bei konstanter MgAc_2 -Konzentration (22 mM) konnte die optimale dNTP-Konzentration für das MMuLV RT Template mit 2,5 mM je dNTP (10 mM gesamt) ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Das entsprach einem MgAc_2 -Überschuss von 6 mM.

Weiterhin wurde untersucht, ob die endogen exprimierte MMuLV RT unter diesen Bedingungen die NASBA ohne Zugabe exogener MMuLV RT (NEB) antreiben konnte. Dazu wurden kombinierte Ansätze aus NASBA und PURE System mit dem MMuLV RT-Template inkubiert und jeweils auf Oligonukleotide, dNTPs bzw. exogene MMuLV RT (NEB) verzichtet. Als Positivkontrolle diente ein kombinierter Ansatz mit allen Komponenten (kompletter Ansatz). Die exprimierte MMuLV RT konnte in jedem Ansatz detektiert werden (Abb. 36 A). Der kombinierte Ansatz ohne zusätzliche dNTPs ergab eine verringerte Proteinexpression (Abb. 36 A, Spur 3).

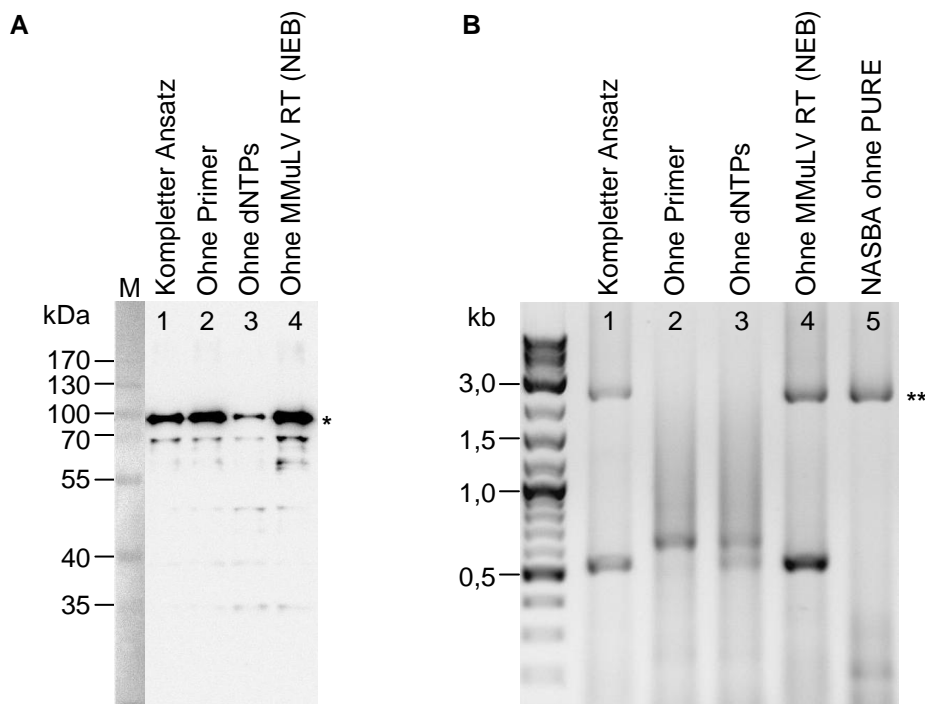


Abb. 36: Nachweis der aktiven, endogen exprimierten MMuLV RT in einem kombinierten Ansatz aus NASBA und PURE System

Kombinierte Ansätze mit dem PURE System (70%), 18 ng/ μL Template (MMuLV RT), 9 mM MgAc_2 , 0,345 M Betain und optional 0,325 U/ μL MMuLV RT (NEB), 0,2 μM je Primer (906/908) und 2,5 mM je dNTP wurden für 16 h bei 37°C inkubiert.

(A) Aliquots (4 μL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2, Ziege-anti-Maus-HRP.

(B) Aliquots (6 μL) wurden mit 5 μg RNase A für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt, in 15 μL EB eluiert, mittels Über-PCR amplifiziert und Aliquots (2 μL) gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. Mittels Über-PCR amplifiziertes NASBA-Produkt (**). M: Größenstandard.

Dieser Ansatz hatte gegenüber der Gesamt-Nukleotid-Konzentration (6 mM NTPs) einen Magnesiumionen-Überschuss von 16 mM. Alle anderen Ansätze enthielten, zusätzlich zu den im PURE System enthaltenen 6 mM NTPs, 10 mM dNTPs, so dass ein Mg^{2+} -Überschuss von nur 6 mM vorlag. Das NASBA-Produkt wurde mittels Über-PCR im kompletten Ansatz, im Ansatz ohne MMuLV RT (NEB) und im NASBA-Ansatz (ohne PURE System) detektiert (Abb. 36 B, Spuren 1, 4, 5). In den kombinierten Ansätzen ohne Oligonukleotide bzw. ohne dNTPs konnte kein NASBA-Produkt detektiert werden (Abb. 36 B, Spuren 2, 3). Die Kombination von NASBA und PURE System mit dem MMuLV RT Template funktionierte, wenn dem Ansatz 9 mM $MgAc_2$ und 2,5 mM je dNTP zugegeben wurden. Zusätzlich wurde mit dem kombinierten Ansatz ohne exogene MMuLV RT gezeigt, dass die endogen exprimierte MMuLV RT aktiv genug ist, um ein mittels Über-PCR detektierbares NASBA-Produkt zu generieren. Damit ist die Grundvoraussetzung für ein selbstreplizierendes System gegeben.

3.4.8 Funktioneller, kombinierter Ansatz von NASBA und PURE System

Für eine Kombination aus DNA-Amplifikation mittels NASBA und *in vitro* Proteinsynthese müssen verschiedene Parameter beachtet und speziell Mg^{2+} - und Nukleotidkonzentrationen millimolar genau eingestellt werden. In den vorangegangenen Kapiteln wurden die optimalen Pufferbedingungen ermittelt, so dass es sogar möglich war das System über die endogen exprimierte MMuLV RT anzutreiben. Für einen Standard Ansatz aus NASBA und PURE System wurde die folgende Zusammensetzung ermittelt:

- 50% PURE System Lösung A
- 20% PURE System Lösung B
- 2,5 mM dNTPs
- 0,2 μ M je Primer
- 9 mM $MgAc_2$
- 18 ng/ μ L DNA-Template
- 0,25 – 0,5 M Betain (je nach verfügbarem Volumen)

Die Inkubation wurde bei 37°C für mindestens 5 h durchgeführt.

3.4.9 Kinetik des kombinierten Ansatzes

Mit der Bestimmung der Kinetik des kombinierten Ansatzes aus NASBA und PURE System sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt die endogen exprimierte MMuLV RT ein detektierbares NASBA-Produkt generieren konnte. Dazu wurde der kombinierte Ansatz über einen Zeitraum von 16 Stunden bei 37°C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen. Die Expression der MMuLV RT konnte bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde nachgewiesen werden (Abb. 37 A). Das durch die endogen exprimierte MMuLV RT generierte NASBA-Produkt konnte nach 4 h Inkubation mittels Über-PCR detektiert werden (Abb. 37 B). Nach 16-stündiger Inkubation konnte kein NASBA-Signal mehr detektiert werden. Das Template ließ sich zu allen Zeitpunkten mittels Über-PCR nachweisen, nach 16 h Inkubation resultierte die Über-PCR in einem deutlich schwächeren Signal als nach 6 h Inkubation. In vorhergehenden Versuchen konnte das Template bereits nach 12 h Inkubation nicht mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für diesen Effekt sind wahrscheinlich Nukleasen verantwortlich, die sowohl das DNA-Template, als auch das NASBA-Produkt abbauen können.

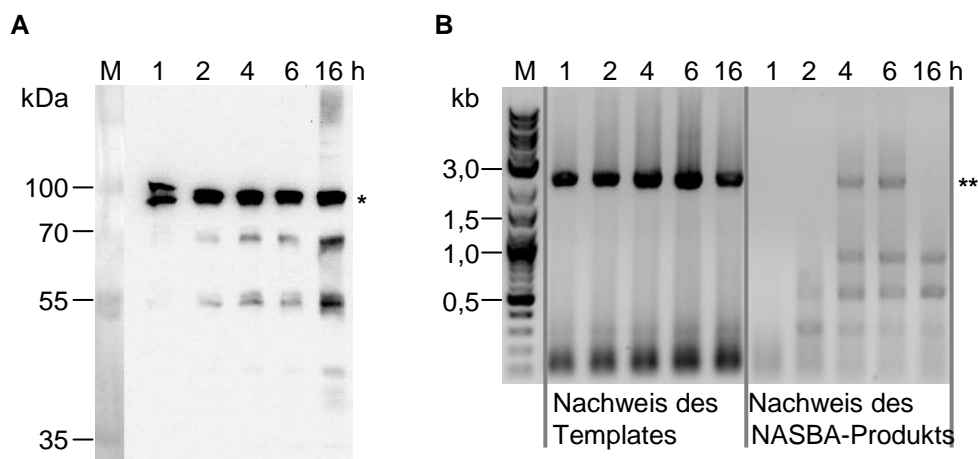


Abb. 37: Zeitliche Analyse des kombinierten Ansatzes

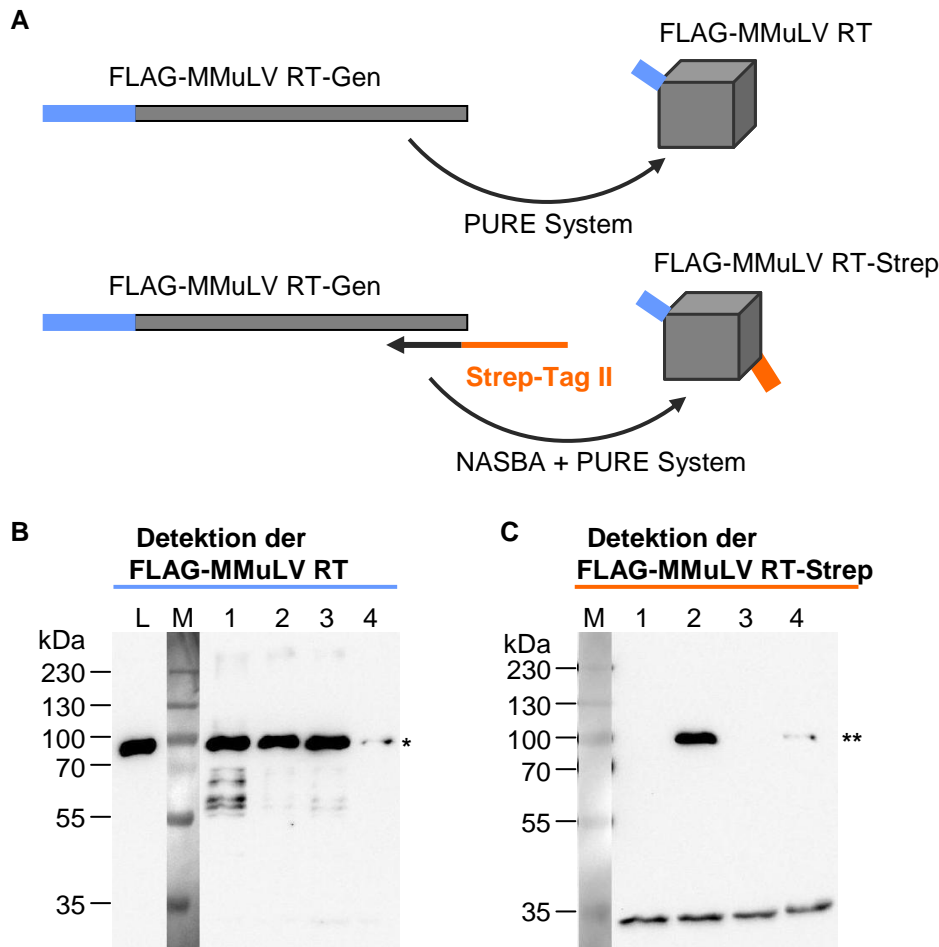
Der kombinierte Ansatz bestehend aus PURE System (70%), 0,2 µM je Primer (634/442), 18 ng/µL Template (MMuLV RT), 2,5 mM je dNTP, 9 mM MgAc₂ und 0,345 M Betain wurde über einen Zeitraum von 16 h bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots (2,5 µL) entnommen und an Streptavidin-Magnetische Partikel gekoppelt.

(A) Proteine in den Überständen der magnetischen Partikel wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2, Ziege-anti-Maus-HRP.

(B) Die an Streptavidin-Magnetische Partikel gekoppelten Proben wurden mittels Über-PCR amplifiziert. Der Nachweis des Templates (MMuLV RT) erfolgte mit den Primern 441/442, der Nachweis des NASBA-Produkts (**) mit den Primern 887/888. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. M: Größenstandard.

3.4.10 Nachweis der Proteinexpression von NASBA-Produkt

Im zu etablierenden Evolutionssystem soll das DNA-Template mittels NASBA amplifiziert werden und das NASBA-Produkt als Template für die Proteinexpression dienen. Da die Proteinexpression bisher nur von DNA-Template gezeigt wurde, soll in diesem Versuch untersucht werden, ob die Proteinexpression ausgehend von NASBA-Produkt stattfindet. Dazu wurde ein Oligonukleotid konstruiert, das sowohl als NASBA Reverse-Oligonukleotid fungierte, als auch den Strep-Tag II kodierte. Die Expression der MMuLV RT ausgehend vom DNA-Template kann über den N-terminalen FLAG-Tag nachgewiesen werden. Findet eine Expression vom NASBA-Produkt statt, so sollte die MMuLV RT nicht nur mittels FLAG-Tag, sondern auch über den, während der NASBA eingebauten, Strep-Tag II detektierbar sein (Abb. 38 A). Als Kontrollen wurden Templates mit den Standard-Oligonukleotiden, den NASBA-Oligonukleotiden (634/442) und mit dem, Strep-Tag II kodierendem, NASBA-Oligonukleotid (634/948) mittels PCR generiert und mit dem PURE System exprimiert. Der Proteinexpressions-Nachweis mittels anti-FLAG-Antikörper ergab in den Ansätzen, ausgehend von einem PCR-Produkt, jeweils ein starkes FLAG-MMuLV RT-Signal (Abb. 38 B, Spuren 1 – 3). Bei der Proteinexpression, ausgehend vom NASBA-Produkt, konnten sowohl die FLAG-MMuLV RT (Abb. 38 B, Spur 4) als auch die Strep-getaggte MMuLV RT nachgewiesen werden (Abb. 38 C, Spur 4). Bei der Expression des PCR-Produkts, das mit den Oligonukleotiden 634/948 (948 kodierte für den Strep-Tag II) generiert wurde, konnte die Strep-getaggte MMuLV RT ebenfalls detektiert werden (Abb. 38 C, Spur 2). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Proteinexpression ausgehend von einem NASBA-Produkt funktioniert. Die Proteinexpression vom NASBA-Produkt ist allerdings insgesamt weniger effizient als von DNA-Template. Die verringerte Effizienz kann sich zum Teil dadurch erklären, dass während der NASBA-Amplifikation Insertionen und Deletionen in das NASBA-Produkt eingebracht werden (siehe Kapitel 3.5.3 und 3.5.5) und dieses somit teilweise für nicht-funktionelles Protein kodiert. Eine weitere Ursache ist wahrscheinlich der ineffiziente Einbau des T7 Promotor-kodierenden *Forward*-Primers (siehe Kapitel 3.1.12), wodurch nur ein Teil des NASBA-Produkts als funktionelles Template für die Proteinsynthese zur Verfügung steht.



Mit dem PURE System wurde exprimiert:

- 1: PCR-Produkt FLAG-MMuLV RT (1/2)
- 2: PCR-Produkt FLAG-MMuLV RT-Strep (634/948)
- 3: PCR-Produkt FLAG-MMuLV RT (634/442)
- 4: NASBA-Produkt FLAG-MMuLV RT-Strep (634/948)

Abb. 38: Nachweis der Proteinexpression von NASBA-Produkt

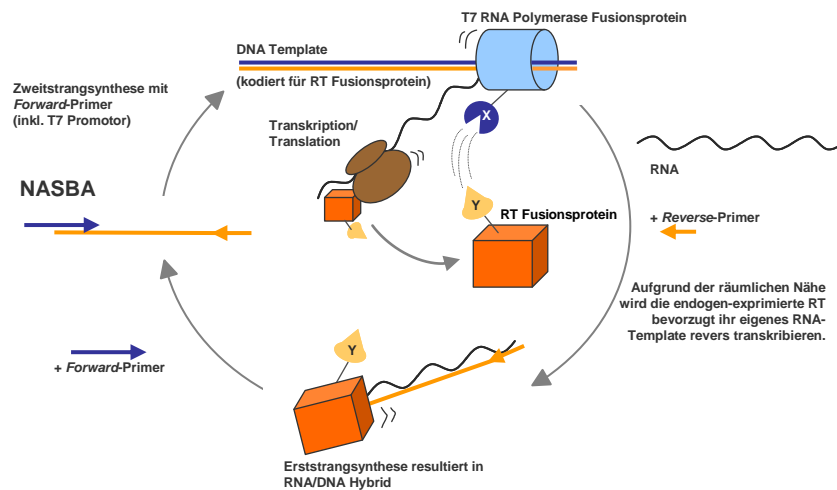
(A) Schema für den Nachweis der, ausgehend vom NASBA-Produkt, exprimierten MMuLV RT. Das Strep-Tag II-kodierende Oligonukleotid wird während der NASBA in das NASBA-Produkt eingebaut und dann mit dem PURE System als Strep-Tag II am C-Terminus der MMuLV RT exprimiert.

(B) Ansätze mit dem PURE System (70%), 0,325 M Betain, 22 ng/μL Template bzw. 55 ng/μL NASBA-Produkt wurden für 8 h bei 37°C inkubiert, Aliquots mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die MMuLV RT mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2 und Ziege-anti-Maus-HRP (*) bzw. Strep-Tactin-HRP (**) in (C). Die NASBA für den Ansatz in Spur 4 wurde standardmäßig mit 10% DMSO, 5 ng/μL Template (MMuLV RT) und 0,2 μM je Primer (634/948) für 5 h bei 37°C inkubiert und mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt. Primer 948 fungierte als NASBA Reverse-Primer und enthielt die Strep-Tag II-Sequenz. L: MMuLV RT exprimierendes *E. coli* Lysat (2 μL). M: Größenstandard.

3.4.11 Zusammenfassung

- * Kombination von NASBA und *in vitro* Proteinsynthese (PURE System) funktioniert nach exakter Titrierung der Magnesium- und Nukleotidkonzentrationen
- * *E. coli* Lysate inhibieren die NASBA
- * endogen exprimierte MMuLV RT ist aktiv
- * Proteinexpression von NASBA-Produkt funktioniert, aber deutlich ineffizienter als von DNA-Template

3.5 Selektion und Mutationsanalyse



Beide in die NASBA involvierten Enzyme, T7 RNAP und MMuLV RT, besitzen keine *proof-reading*-Aktivität und verursachen Mutationen während der RNA- bzw. cDNA-Synthese. Über diese zwei Enzyme sollen während der Evolutionsreaktion Mutationen in das DNA-Template eingebracht werden. Die Fehlerrate der T7 RNAP wird mit 6×10^{-5} /Basenpaar beschrieben (Brakmann & Grzeszik, 2001), die der MMuLV RT mit 2×10^{-6} /Basenpaar (Varela-Echavarría *et al.*, 1992).

3.5.1 NASBA in der Kapillare

Der Vorteil eines höher affinen Bindeparspartners im Evolutionssystem entsteht durch dessen räumliche Nähe zu einer replizierenden Reversen Transkriptase. Die erhöhte Replikationsrate ermöglicht es der höher affinen Variante in Form einer Replikationswelle entlang der Kapillare zu wandern und dadurch aus einem Variantenpool selektiert zu werden. In einem ähnlichen System konnte gezeigt werden, dass eine Reaktionsfront aus selbstreplizierenden RNA-Molekülen in einer Kapillare zusammen mit der Q β Replikase mit einer Geschwindigkeit von 3,6 cm/h wandert (Bauer *et al.*, 1989). Es wurde versucht, die NASBA in einer Glaskapillare oder einem PTFE-Schlauch wandern zu lassen. Dazu wurde die Kapillare oder der PTFE-Schlauch mit NASBA Lösung befüllt, an einem Ende das Template zugegeben und für 2 – 12 h bei 37°C inkubiert. Zur Fraktionierung wurden die Kapillare bzw. der PTFE-Schlauch in 2 – 3 cm große Stücke geteilt. Die Analyse der einzelnen Fraktionen zeigte, dass das NASBA-Produkt ebenso wie das Template in mehreren Fraktionen detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es konnte daher nicht zwischen einer aktiven Wanderung der Reaktion und einer passiven Diffusion unterschieden werden. Die Diffusion des Templates sollte mittels Erhöhung der Viskosität innerhalb der Kapillare unterbunden werden. Zur Erhöhung der Viskosität wurde die NASBA mit Polyethylenglykol bzw. linearem Polyacrylamid (LPAA) versetzt. Die Zugabe von 5% LPAA verhinderte die Durchmischung des Templates in der Kapillare (Daten nicht gezeigt), es konnte allerdings keine aktive Wanderung der NASBA-Reaktion gezeigt werden. Die Zugabe von 5% LPAA in den kombinierten Ansätzen aus NASBA und PURE System war aufgrund des begrenzten Volumens nicht möglich. Als Alternative zur Selektion in der Kapillare wurde daher der serielle Transfer verwendet.

3.5.2 Serieller Transfer der NASBA

Das Prinzip des seriellen Transfers in Kombination mit einem *in vitro* replizierenden System ermöglicht das Anlegen eines Selektionsdruckes hinsichtlich schnellerer Replikation. Beim seriellen Transfer wurden von mehreren Gruppen unabhängig Deletionen beobachtet, die zu verkürzten Nukleinsäuremolekülen führten. Diese Moleküle konnten sich aufgrund der höheren Replikationsrate gegenüber längeren Nukleinsäuremolekülen durchsetzen (Walter & Strunk, 1994; Oehlenschläger & Eigen, 1997). Weiterhin wurde von einer *de novo* Synthese von RNA-Molekülen in einem seriellen Transfer-Experiment berichtet (Breaker & Joyce, 1994). In dieser Arbeit wurde der serielle Transfer der NASBA mit zwei verschiedenen Templates (Renilla, MMuLV RT) getestet. Dazu wurden 50% der NASBA nach 0,5 – 1 h Inkubationszeit in ein Reaktionsgefäß mit unverbrauchten NASBA Komponenten (ohne Template) transferiert. Die mit dem Renilla-Template angeimpfte NASBA konnte mindestens 16-mal transferiert werden (Abb. 39 A), die NASBA mit dem MMuLV RT-Template insgesamt 6-mal (Abb. 39 B).

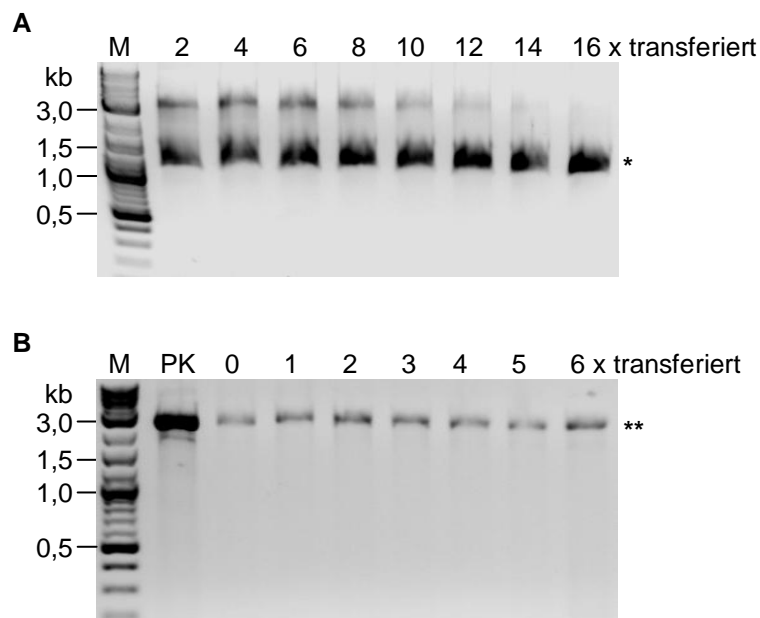


Abb. 39: Serieller Transfer der NASBA

(A) NASBA Reaktionen mit 10% DMSO, 0,2 μ M je Primer (979/981) und 5 ng/ μ L Template (Renilla) im 1. Ansatz wurden bei 37°C inkubiert und alle 30 min zu 50% in Reaktionsgefäße mit unverbrauchten NASBA-Komponenten (ohne Template) transferiert. Aliquots (2 μ L) wurden in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. NASBA-Produkt (*).

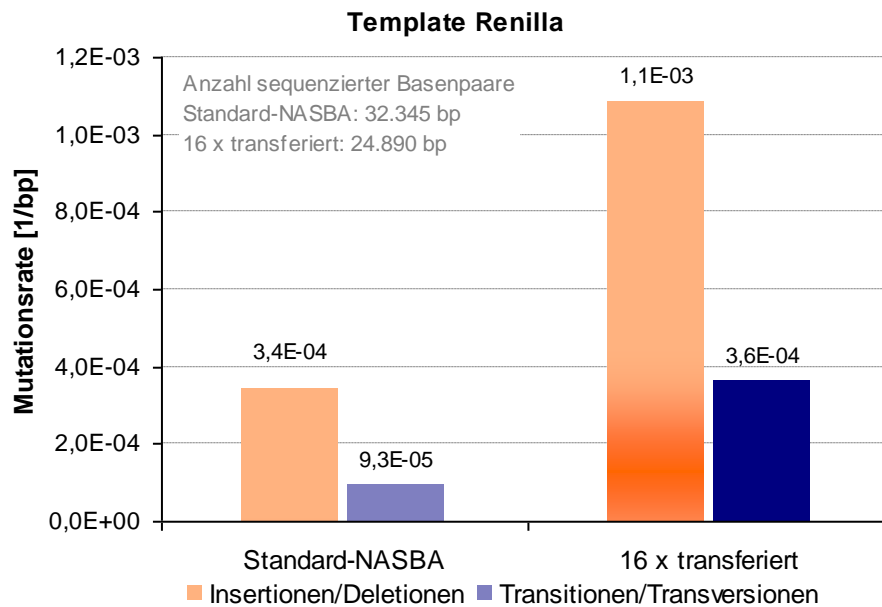
(B) NASBA Reaktionen mit 0,5 M Betain, 0,2 μ M je Primer (979/981) und 5 ng/ μ L Template (MMuLV RT) im 1. Ansatz wurden bei 37°C inkubiert und alle 60 min zu 50% in Reaktionsgefäße mit unverbrauchten NASBA-Komponenten (ohne Template) transferiert. Aliquots (2 μ L) wurden in RNase A-haltigem Ladepuffer gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt. NASBA-Produkt (**). PK: Für 6 h bei 37°C inkubierte NASBA. M: Größenstandard.

3.5.3 Mutationsanalyse der NASBA-Produkte

Für die Mutationsanalyse des NASBA-Produkts (Renilla) wurde die 16-fach transferierte NASBA mit der nicht-transferierten NASBA (= Standard), beide aus Kapitel 3.5.2, verglichen. Dabei wurde zwischen Insertionen/Deletionen, die zu einem unerwünschten *Frameshift* im Gen und damit zu nicht-funktionellem Protein führten, und Transitionen/Transversionen unterschieden. Die Sequenzanalyse ergab für die Standard-NASBA eine Fehlerrate von $3,4 \times 10^{-4}$ /bp für

Insertionen/Deletionen und $9,3 \times 10^{-5}/\text{bp}$ für Transitionen/Transversionen. Bei der 16-fach transferierten NASBA stiegen die Fehlerraten um den Faktor 3,2 auf $1,1 \times 10^{-3}/\text{bp}$ (Insertionen/Deletionen) und um den Faktor 3,9 auf $3,6 \times 10^{-4}/\text{bp}$ (Substitutionen) an (Abb. 40 A). Durch den wiederholten Transfer der NASBA konnte die Mutationsrate wesentlich gesteigert werden. Im Vergleich zu den einzelnen Mutationsraten von T7 RNAP und MMuLV RT laut Literatur (siehe Kapitel 3.5), kann in der NASBA mit beiden Enzymen in Kombination eine deutlich höhere Fehlerrate erreicht werden.

A



B

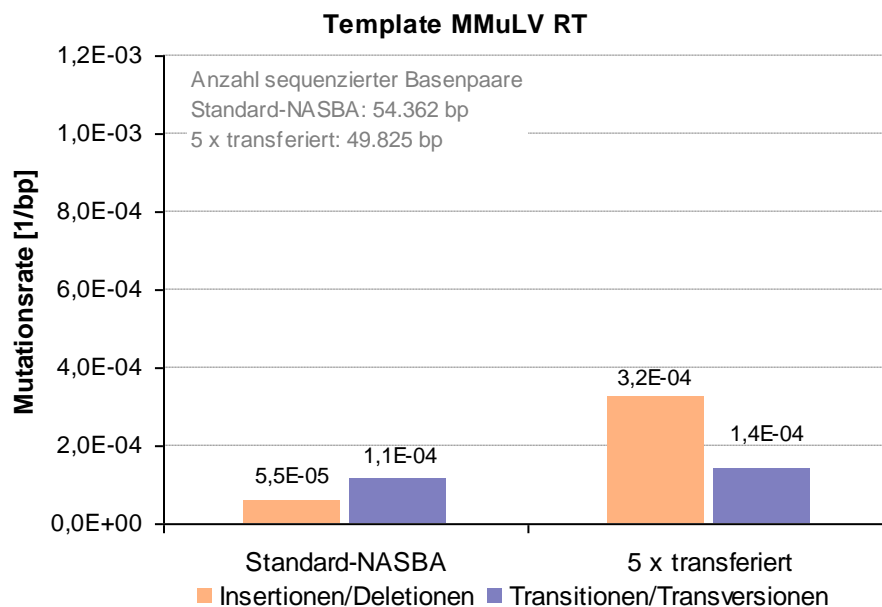


Abb. 40: Mutationsanalyse der NASBA-Produkte

NASBA-Produkten wurden mittels Über-PCR (Primer 1006/1007) die Restriktionsschnittstellen EcoRI/ClaI angefügt und das Über-PCR-Produkt in den Vektor pSc kloniert. (A) Mutationsanalyse der Standard-NASBA und der 16-mal transferierten NASBA (Renilla). Sequenzierungen erfolgten bei der GENEART AG (Primer 1/2).

(B) Mutationsanalyse der Standard-NASBA und der 5-mal transferierten NASBA (MMuLV RT). Sequenzierungen erfolgten bei der GENEART AG (Primer 799/800/1131). Die Sequenzanalysen erfolgten mit dem Programm SeqMan Pro (DNASTAR).

Für die Mutationsanalyse des MMuLV RT-NASBA-Produkts wurden die 5-fach transferierte NASBA und die nicht-transferierte NASBA (= Standard-NASBA) aus Kapitel 3.5.2 verwendet. Die Sequenzanalyse ergab für die Standard-NASBA eine Mutationsrate von $5,5 \times 10^{-5}$ Insertionen bzw. Deletionen pro Basenpaar, das entspricht in etwa der laut Literatur beschriebenen Mutationsrate für die T7 RNAP (Brakmann & Grzeszik, 2001). Bei der 5-fach transferierten NASBA stieg die Mutationsrate um den Faktor 5,8 auf $3,2 \times 10^{-4}$ /bp an. Die Anzahl an Transitionen/Transversionen bei der Standard-NASBA belief sich auf $1,1 \times 10^{-4}$ /bp und blieb auch nach 5-fachem Transfer mit $1,4 \times 10^{-4}$ /bp ungefähr gleich. Die Mutationsrate konnte nach 5-fachem Transfer nur hinsichtlich der Insertionen/Deletionen gesteigert werden (Abb. 40 B). Auch bei der NASBA mit MMuLV RT-Template lag die Mutationsrate insgesamt über den Werten der Literatur (siehe Kapitel 3.5).

Neben der quantitativen Mutationsanalyse wurden die Sequenzbereiche untersucht, in denen die Mutationen während der NASBA auftraten. Dabei zeigten sich Substitutionen vermehrt im Genabschnitt + 1070 bis + 1230 bp im MMuLV RT-Gen (Abb. 41). Insertionen/Deletionen konnten vor allem in Adenosin- bzw. Thymin-reichen Genabschnitten beobachtet werden. Da dieselben Insertionen/Deletionen in mehreren Klonen auftraten, wurden sie als *Mutations-Hot Spots* definiert (Abb. 41). Insertionen/Deletionen sind, da sie aufgrund des *Frameshifts* für nicht funktionelles Protein kodieren, ungewollt. Die Anzahl an *Frameshifts* sollte reduziert werden, indem zwei *Mutations-Hot Spots* durch den Einbau alternativer Kodons entfernt wurden. In der darauffolgenden Mutationsanalyse zeigten sich Insertionen und Deletionen an alternativen Adenosin- bzw. Thymin-reichen Genabschnitten oder auch weiterhin an den modifizierten *Hot Spot*-Positionen im MMuLV RT-Gen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass die Mutationen nicht ausschliesslich durch Adenosin- bzw. Thymin-reiche Stellen bedingt entstehen. Auch die flankierenden Sequenzen, möglicherweise durch ihre dreidimensionale Struktur, scheinen einen Einfluss zu haben.

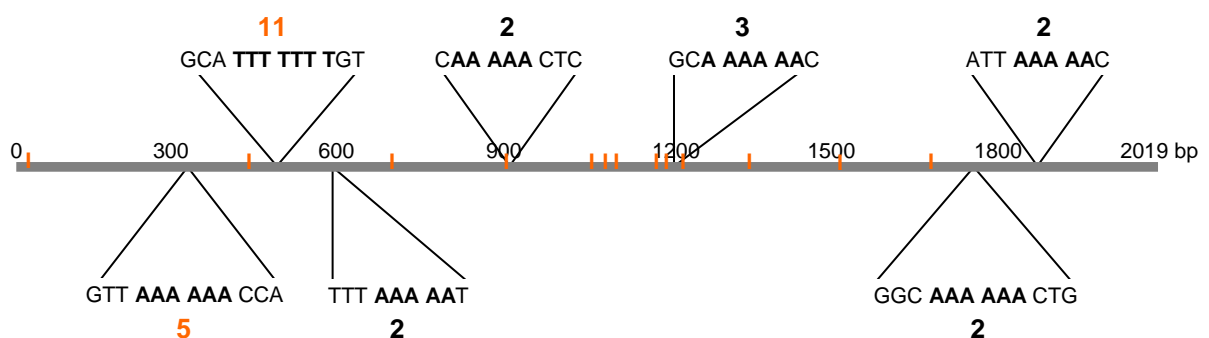


Abb. 41: Schematische Darstellung der Mutationen im offenen Leserahmen des NASBA-Produkts (MMuLV RT)

Dargestellt ist das 2019 bp lange MMuLV RT-Gen. Anhand von Sequenzdaten ermittelte Insertionen/Deletionen traten in den fett markierten Sequenzabschnitten auf. Zahlen geben die Anzahl an Klonen mit dieser Mutation an. Substitutionen sind durch orange Striche dargestellt. Orange Zahlen markieren die *Hot Spots*, die durch den Einbau alternativer Kodons entfernt wurden.

3.5.4 Anwendung der Kombination von NASBA und PURE Δ T7 RNAP System

Soll das etablierte System aus DNA-Amplifikation mittels NASBA und Proteinsynthese im PURE System mit Interaktionspärchen getestet werden, so ist es notwendig, die standardmäßig im PURE System enthaltene T7 RNAP durch ein selbst hergestelltes Fusionsprotein zu ersetzen. Dazu wurde ein PURE System, das keine T7 RNAP enthält verwendet. Die Kombination von NASBA und PURE Δ T7 RNAP System (PURE::NASBA) sollte zunächst bei der Interaktion zwischen der SH3-Domäne Yes1 und einem PxxP-Motiv des src-assoziierten Sam68 getestet werden. Laut Mayer (2001) besitzen SH3-Domänen eine moderate Affinität ($K_d = 1 - 100 \mu\text{M}$) und Selektivität zu ihren PxxP-Motiven. In der AG Wagner konnte neben dem Yes1-bindenden PxxP-Motiv (P5) ein nicht-bindendes PxxP-Motiv (P1) identifiziert werden (Asbach, 2010). Zusätzlich wurde eine Phagen *Display*-gereifte SH3-Domäne (Yes1mut) beschrieben, die verglichen zur Yes1wt-Variante eine 67-fach höhere Affinität zum P5-Motiv des Sam68-Proteins aufweist (Kellner, 2007). Zunächst wurde untersucht, ob das Yes1-bindende PxxP-Motiv (P5) im Vergleich zum nicht-bindenden P1 in einem kombinierten Reaktionsansatz von NASBA und PURE Δ T7 RNAP System aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Interaktionspartner zu einer effizienteren Amplifikation des DNA-Templates führt.

Dazu wurde das PURE Δ T7 RNAP System mit einer T7 RNAP in Fusion mit jeweils einem der beiden PxxP-Motive (siehe Kapitel 3.2.4) supplementiert und die Yes1mut-MMuLV RT als DNA-Template sowie alle benötigten NASBA-Komponenten zugegeben. Zusätzlich wurden beide Ansätze einmal zu 50% auf unverbrauchte PURE::NASBA-Komponenten transferiert.

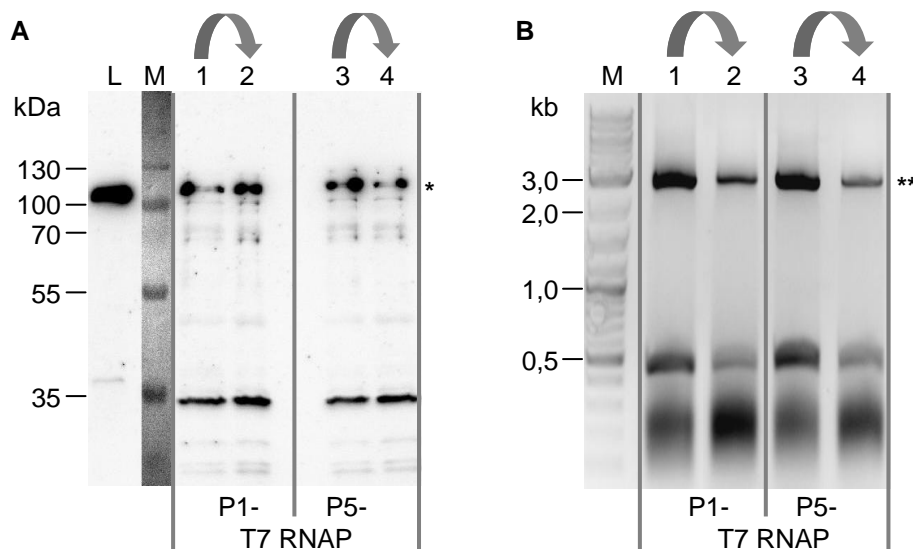


Abb. 42: Kombinierte Ansätze von NASBA und PURE System mit einem Transfer

Kombinierte Ansätze mit dem PURE Δ T7 RNAP System (70%), 0,2 μM je Primer (979/981), 16 ng/ μL Template (Yes1mut-MMuLV RT) und 10 ng/ μL der P1- bzw. P5-T7 RNAP wurden für 4,5 h bei 37°C inkubiert. 50% je Ansatz wurden in ein Reaktionsgefäß mit unverbrauchten NASBA-Komponenten (ohne Template) transferiert (Pfeil) und erneut 4,5 h bei 37°C inkubiert.

(A) Aliquots (2,5 μL) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Yes1mut-MMuLV RT (*) mittels Western Blot und Immunfärbung detektiert. Nachweissystem: Maus-anti-FLAG M2, Ziege-anti-Maus-HRP. L: Yes1mut-MMuLV RT exprimierendes *E. coli* Lysat (2 μL).

(B) Aliquots (5 μL) wurden mit 5 μg RNase A für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 15 μL EB eluiert (= NASBA-Produkt Yes1mut-MMuLV RT). NASBA-Produkt (0,5 μL) wurde mittels Über-PCR mit den Primern 1086/1007 amplifiziert und gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgetrennt (**). M: Größenstandard.

Alle Ansätze wurden hinsichtlich der Proteinexpression und der NASBA-Amplifikation untersucht. In allen Ansätzen konnte die exprimierte Yes1mut-MMuLV RT detektiert werden (Abb. 42 A). Die mittels Über-PCR amplifizierten NASBA-Produkte zeigten bereits nach einem Transfer eine Abnahme in der NASBA-Amplifikation (Abb. 42 B). Wahrscheinlich dünnt sich das NASBA Signal aus, weil nicht genügend Yes1mut-MMuLV RT endogen im System synthetisiert wird, oder die Aktivität der Yes1mut-MMuLV RT nicht ausreicht, um eine NASBA anzutreiben. Nach einem zweiten Transferschritt kam es zu einer weiteren Abnahme des NASBA-Signals und zu einer Reduktion der Yes1mut-MMuLV RT-Expression (Daten nicht gezeigt), dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die ineffiziente Translation des NASBA-Produkts zurückzuführen (siehe Kapitel 3.4.9).

3.5.5 Mutationsanalyse des kombinierten Ansatzes

Für die Mutationsanalyse der kombinierten Ansätze aus NASBA und PURE Δ T7 RNAP System wurden die mittels Über-PCR amplifizierten NASBA-Produkte (Yes1mut-MMuLV RT) aus Abb. 42 B untersucht. Die Sequenzanalysen ergaben für Ansätze mit der P1-T7 RNAP eine Mutationsrate von $5,0 \times 10^{-5}$ /bp Insertionen/Deletionen und $2,5 \times 10^{-5}$ /bp Punktmutationen. Transferierte Ansätze mit der P1-T7 RNAP resultierten in etwas höheren Fehlerraten, $1,2 \times 10^{-4}$ /bp Insertionen/Deletionen und $7,0 \times 10^{-5}$ /bp Punktmutationen. Die Analyse der Ansätze mit P5-T7 RNAP ergab insgesamt niedrigere und eine für Punktmutationen bzw. Insertionen/Deletionen identische Fehlerrate von $7,5 \times 10^{-6}$ /bp. Einmal transferierte Ansätze mit der P5-T7 RNAP ergaben gegenüber nicht-transferierten Ansätzen eine um den Faktor 6,5 erhöhte Mutationsrate von $4,9 \times 10^{-5}$ /bp (Abb. 43).

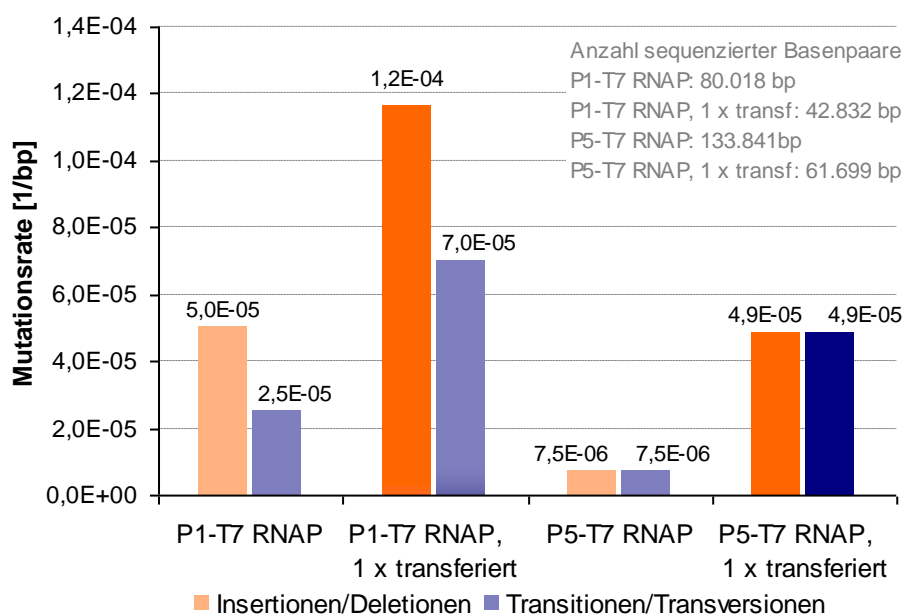


Abb. 43: Mutationsanalyse des PURE::NASBA-Produkts (MMuLV RT)

Mittels Über-PCR amplifizierte NASBA-Produkte aus den kombinierten Ansätzen wurden über die Restriktionsschnittstelle ClaI in den Vektor pSc kloniert. Klone mit korrekter Insertlänge wurden mittels Kolonie-PCR (Primer 1/2) verifiziert und bei der GENEART AG sequenziert (Primer 799/800/1131). Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm SeqMan Pro (DNASTAR).

3.5.6 Anreicherungstest „*survival of the fittest*“

„*Survival of the fittest*“ bedeutet im Sinne von Darwin's Evolutionstheorie das Überleben der bestangepassten Individuen aufgrund ihrer überdurchschnittlichen Reproduktionsfähigkeit.

In einem kombinierten Ansatz aus NASBA und PURE System sollten sich diejenigen Varianten durchsetzen bzw. am stärksten amplifizieren (reproduzieren), die im Vergleich zu anderen eine höhere Affinität zum T7 RNAP-Fusionsprotein besitzen. Getestet wurden zunächst die zwei Yes1-Varianten zusammen mit der P5-T7 RNAP. Da die Yes1mut-Variante eine 67-fach höhere Affinität gegenüber dem P5-Motiv aufweist als die Yes1wt-Variante (Kellner, 2007), sollte eine Anreicherung der Yes1mut-Variante beobachtbar sein. Es wurde eine Template-Mischung, bestehend aus 75% Yes1wt-MMuLV RT-Gen und 25% Yes1mut-MMuLV RT-Gen, in einen kombinierten Ansatz aus NASBA und PURE Δ T7 RNAP System, supplementiert mit der P5-T7 RNAP, eingesetzt. Als Kontrolle fungierte ein Ansatz, der anstelle der P5-T7 RNAP eine native T7 RNAP (NEB) ohne Fusionspartner enthielt. Da die Klonierungseffizienz amplifizierter NASBA-Produkte in vorhergehenden Versuchen nur eine begrenzte Anzahl an Klonen zur Analyse lieferte, wurde zunächst ein Nachweis mittels *real-time* PCR etabliert. Dabei wurde in Abhängigkeit der eingesetzten Primer spezifisch die Sequenz der Yes1wt-MMuLV RT bzw. Yes1mut-MMuLV RT amplifiziert und der prozentuale Anteil anhand einer Standardreihe für den jeweiligen Primer bestimmt. Da der Nachweis mittels *real-time* PCR eine äußerst sensitive Methode zur Detektion des NASBA-Produkts darstellt, konnten die PURE::NASBA-Ansätze bis zu dreimal seriell transferiert werden.

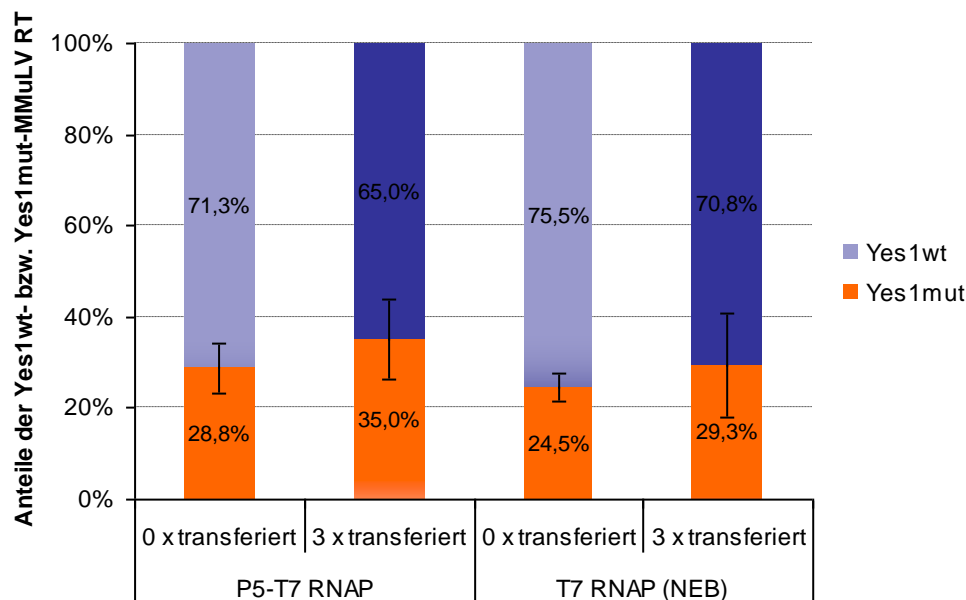


Abb. 44: Test auf Anreicherung der Yes1mut-MMuLV RT in PURE::NASBA-Ansätzen

Kombinierte Ansätze mit dem PURE Δ T7 RNAP System (70%), 0,2 μ M je Primer (906/908), 18 ng/ μ L Template (75% Yes1wt-MMuLV RT und 25% Yes1mut-MMuLV RT) und 8,4 ng/ μ L P5-T7 RNAP bzw. 4 ng/ μ L T7 RNAP (NEB) wurden für 8 h bei 37°C inkubiert. 50% je Ansatz wurden in ein Reaktionsgefäß mit unverbrauchten NASBA-Komponenten (ohne Template) transferiert und erneut 8 h bei 37°C inkubiert. Der serielle Transfer wurde dreimal wiederholt. Aliquots (5,5 μ L) von dreimal und nicht transferierten Ansätzen wurden mit 5 μ g RNase A für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 15 μ L EB eluiert (= NASBA-Produkt). Der Anteil beider Yes1-Varianten im NASBA-Produkt wurde mittels *real-time* PCR (Primer 1354/1355/1131) quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei unabhängigen Versuchsansätzen und jeweils zwei *real-time* Analysen ermittelt.

Die Analyse mittels *real-time* PCR zeigte, dass unabhängig von der eingesetzten T7 RNAP-Variante eine minimale Anreicherung der Yes1mut-MMuLV RT stattfand (siehe Abb. 44). Aufgrund der nur moderaten Bindungsaffinität einer SH3-Domäne zu ihrem Liganden (Mayer, 2001), war die Affinität der Yes1mut-MMuLV RT zum P5-Motiv möglicherweise nicht ausreichend, um einen Replikations- bzw. Selektionsvorteil und damit eine Anreicherung im Evolutionssystem zu bieten.

Daher sollte mit einem alternativen Interaktionspaar die Anreicherung eines höher affinen Bindepartners nachgewiesen werden. Streptavidin und Biotin bilden einen starken, nichtkovalenten Komplex mit femtomolarer Affinität aus (Argaraña *et al.*, 1986). Schmidt & Skerra (1993) isolierten aus einer Peptid-Bibliothek eine neun Aminosäuren lange Peptidsequenz (AWRHPQFGG), den Strep-Tag, der ebenfalls von Streptavidin gebunden wird. Eine modifizierte Version des Strep-Tags, der Strep-Tag II (NWSHPQFEK), ist nicht mehr auf eine freie Carboxygruppe angewiesen und daher auch zur N-terminalen Fusion an rekombinantes Protein geeignet (Schmidt *et al.*, 1996).

Die MMuLV RT-Sequenz wurde mit einem N-terminalen Strep-Tag II (PCR mit Primern 1276/2) versehen. An den N-Terminus der T7 RNAP wurde die verkürzte Streptavidin-Variante „StrepCore13-139“ (Sano *et al.*, 1995) fusioniert, indem das synthetisch hergestellte StrepCore13-139-Gen über die Schnittstellen NdeI/NheI in das Vektorgerüst pEVHis eingefügt wurde. Das T7 RNAP-Fusionsprotein (StrepCore-T7 RNAP) wurde in *E. coli* exprimiert und mittels HisTALON-Affinitätssäule an einer ÄKTApurifier (GE Healthcare) aufgereinigt. In einem kombinierten Ansatz aus NASBA und PURE Δ T7 RNAP System, supplementiert mit StrepCore-T7 RNAP, sollte sich die MMuLV RT mit fusioniertem Strep-Tag II, aufgrund ihrer erhöhten Affinität zur StrepCore-T7 RNAP, gegenüber einer FLAG-MMuLV RT anreichern. Mittels *real-time* PCR wurde in Abhängigkeit der eingesetzten Primer spezifisch die Sequenz der Strep-MMuLV RT bzw. der FLAG-MMuLV RT amplifiziert und der prozentuale Anteil anhand einer Standardreihe für den jeweiligen Primer bestimmt.

Auch mit diesem Test-Interaktionspaar konnte keine Anreicherung des höher affinen Bindepartners, also der Strep-MMuLV RT, in Abhängigkeit zur StrepCore-T7 RNAP detektiert werden, es zeigte sich vielmehr eine Verringerung des Strep-MMuLV RT-Anteils nach dreimaligem Transfer (siehe Abb. 45). Alle Werte zeigten generell eine hohe Standardabweichung. Der leichte Anstieg an Strep-MMuLV RT im Ansatz mit T7 RNAP (NEB) kann wahrscheinlich auf Messungsschwankungen während der *real-time* PCR zurückgeführt werden. Eine Anreicherung des höher affinen Bindepartners aufgrund seiner *fitness* bzw. stärkeren Replikationsrate konnte mit keinem der beiden Interaktionspaare gezeigt werden. Im nun folgenden Schritt sollen die Affinitäten der einzelnen Interaktionspartner zueinander bestimmt werden.

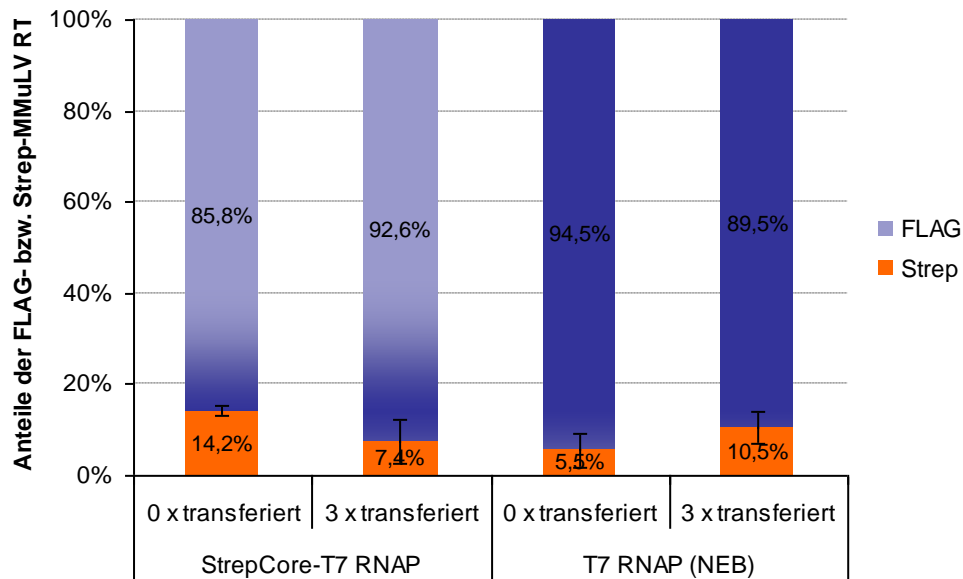


Abb. 45: Test auf Anreicherung der Strep-MMuLV RT in PURE::NASBA-Ansätzen

Kombinierte Ansätze mit dem PURE Δ T7 RNAP System (70%), 0,2 μ M je Primer (979/981), 18 ng/ μ L Template (90% FLAG-MMuLV RT und 10% Strep-MMuLV RT) und 8 ng/ μ L StrepCore-T7 RNAP bzw. 10 ng/ μ L T7 RNAP (NEB) wurden für 8 h bei 37°C inkubiert. 50% je Ansatz wurden in ein Reaktionsgefäß mit unverbrauchten NASBA-Komponenten (ohne Template) transferiert und erneut 8 h bei 37°C inkubiert. Der serielle Transfer wurde dreimal wiederholt. Aliquots (7,5 μ L) von dreimal transferierten und nicht transferierten Ansätzen wurden mit 5 μ g RNase A für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit dem *MinElute PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 15 μ L EB eluiert (= NASBA-Produkt). NASBA-Produkt (0,5 μ L) wurde mittels Über-PCR (Primer 1006/1007) amplifiziert und anschließend der Anteil der FLAG- bzw. Strep-MMuLV RT-Varianten mittels *real-time* PCR (Primer 1286/1287/1131) quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei unabhängigen *real-time* Analysen ermittelt.

3.5.7 Affinitäten zwischen T7 RNAP- und MMuLV RT-Varianten

In den kombinierten Ansätzen von NASBA und PURE Δ T7 RNAP System konnte mit den T7 RNAP-Fusionsproteinen und den verschiedenen MMuLV RT-Varianten keine Anreicherung eines höher affinen Bindepartners detektiert werden. Um sicherzustellen, dass die Interaktion zwischen den Proteinvarianten grundsätzlich stattfindet und dabei verschieden stark ausgeprägt ist, sollten die Affinitäten der Proteinvarianten zueinander bestimmt werden. Im ersten Schritt wurde mittels ELISA die Affinität zwischen T7 RNAP und MMuLV RT, jeweils ohne Interaktionspartner, untersucht. Die ELISA-Signale ergaben, dass beide Proteine unspezifisch aneinander binden, und dass bei Immobilisierung von 50 ng MMuLV RT (NEB) erst ab einer Konzentration von $\sim 12 \mu$ mol/L T7 RNAP (NEB) eine Sättigung eintritt. Durch Auftragung der ELISA-Werte in einem sogenannten *Scatchard Plot* (Scatchard, 1948), konnte eine Affinität beider Proteine zueinander im mikromolaren Bereich ($K_d \sim 27 \mu$ M) bestimmt werden (siehe Abb. 46). Die Dissoziationskonstante K_d entspricht dabei dem negativen reziproken Anstieg der Geraden. Da die unspezifische Affinität zwischen T7 RNAP und MMuLV RT bereits im Bereich der spezifischen Affinität einer SH3-Domäne zu ihrem Liganden liegt, kann bei der Interaktion zwischen Yes1mut-MMuLV RT und P5-T7 RNAP nicht mehr von einem Selektionsvorteil ausgegangen werden.

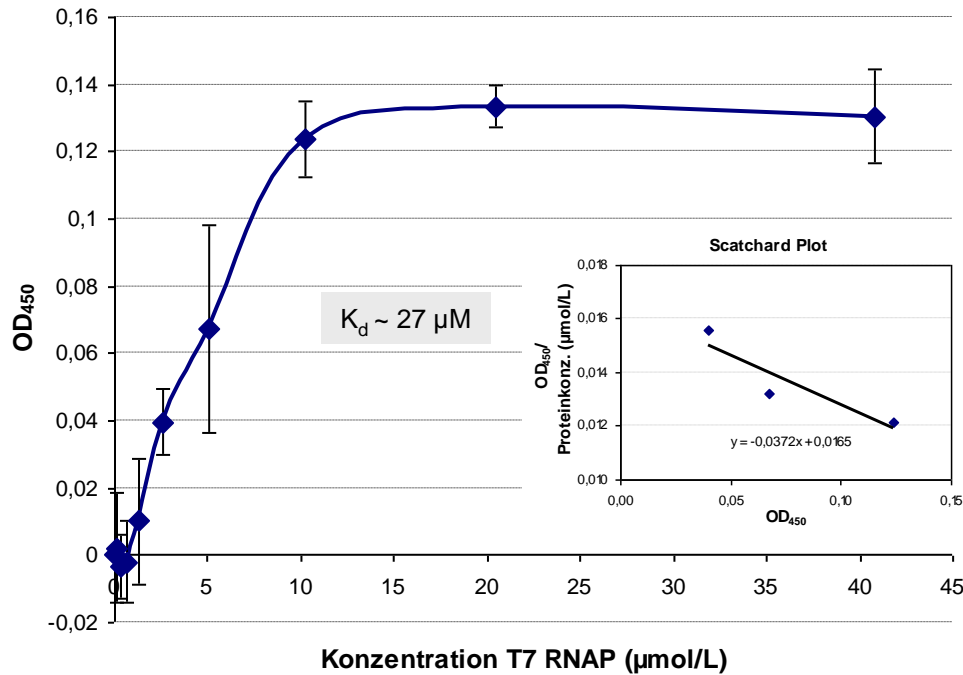


Abb. 46: Affinität zwischen T7 RNAP (NEB) und MMuLV RT (NEB)

Für den ELISA wurden 50 ng MMuLV RT (NEB) jeweils in einer Vertiefung einer MaxiSorp-Platte (Nunc) immobilisiert und mit den angegebenen Konzentrationen an T7 RNAP (NEB) inkubiert. Nachweissystem: Kaninchen-anti-T7 RNAP-Serum und Ziege-anti-Kaninchen-HRP. Als Negativkontrollen wurden je eine Vertiefung ohne immobilisiertes Protein und eine Vertiefung ohne Erst-Antikörper inkubiert. Die Sättigungskurve und die Standardabweichungen ergaben sich aus drei unabhängigen ELISA-Messungen. Die Auswertung als *Scatchard Plot* ermöglichte die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ($K_d = -1/m$).

Im nächsten Schritt wurden die im Rahmen dieser Arbeit generierten Proteinvarianten auf ihre Bindungsaffinitäten zueinander untersucht. Dazu wurden die zuvor affinitätschromatographisch aufgereinigten T7 RNAP-Varianten verwendet (siehe Kapitel 3.2.3). Die verschiedenen MMuLV RT-Varianten wurden im PURE System exprimiert und unaufgereinigt, nach Expressionskontrolle mittels Western Blot, eingesetzt. Trotz unterschiedlich starker Expressionsraten wurde versucht gleiche MMuLV RT-Mengen im ELISA einzusetzen. Nach Immobilisierung der T7 RNAP-Varianten und Inkubation mit verschiedenen MMuLV RTs konnte zwischen der P5-T7 RNAP und den beiden Yes1-Varianten die stärkste Affinität detektiert werden (siehe Abb. 47). Dabei interagierte die P5-T7 RNAP tendenziell etwas stärker mit der Yes1mut-MMuLV RT verglichen zur Yes1wt-MMuLV RT. Dass die Differenz der Affinitäten nicht dem von Kellner (2007) beschriebenen Faktor von 67 entsprach, kann eventuell auf sterische Behinderungen durch die Fusion mit der MMuLV RT zurückgeführt werden.

Die StrepCore-T7 RNAP wies entgegen den Erwartungen eine geringere Affinität zur Strep-getaggen MMuLV RT als zur FLAG-getaggen MMuLV RT auf. Wahrscheinlich ist die Dissoziationskonstante zwischen StrepCore13-139 und Strep-Tag II mit 13 µM (Voss & Skerra, 1997) nicht ausreichend gering genug, da die MMuLV RT bereits mit einer $K_d \sim 27$ µM unspezifisch mit der T7 RNAP interagiert. Ferner erzielten die MMuLV RT-Varianten auch in den Vertiefungen ohne immobilisierte T7 RNAP relativ hohe ELISA-Signale, die wahrscheinlich auf einer unspezifischen Affinität der MMuLV RT zu den im Blockpuffer (MPBST) enthaltenen

Proteinen beruhen. Da keines der getesteten Interaktionspaare eine eindeutige und ausreichend starke Wechselwirkung zueinander erkennen ließ, kann im zu etablierenden Evolutionssystem zunächst einmal keine affinitäts-abhängige Selektion stattfinden.

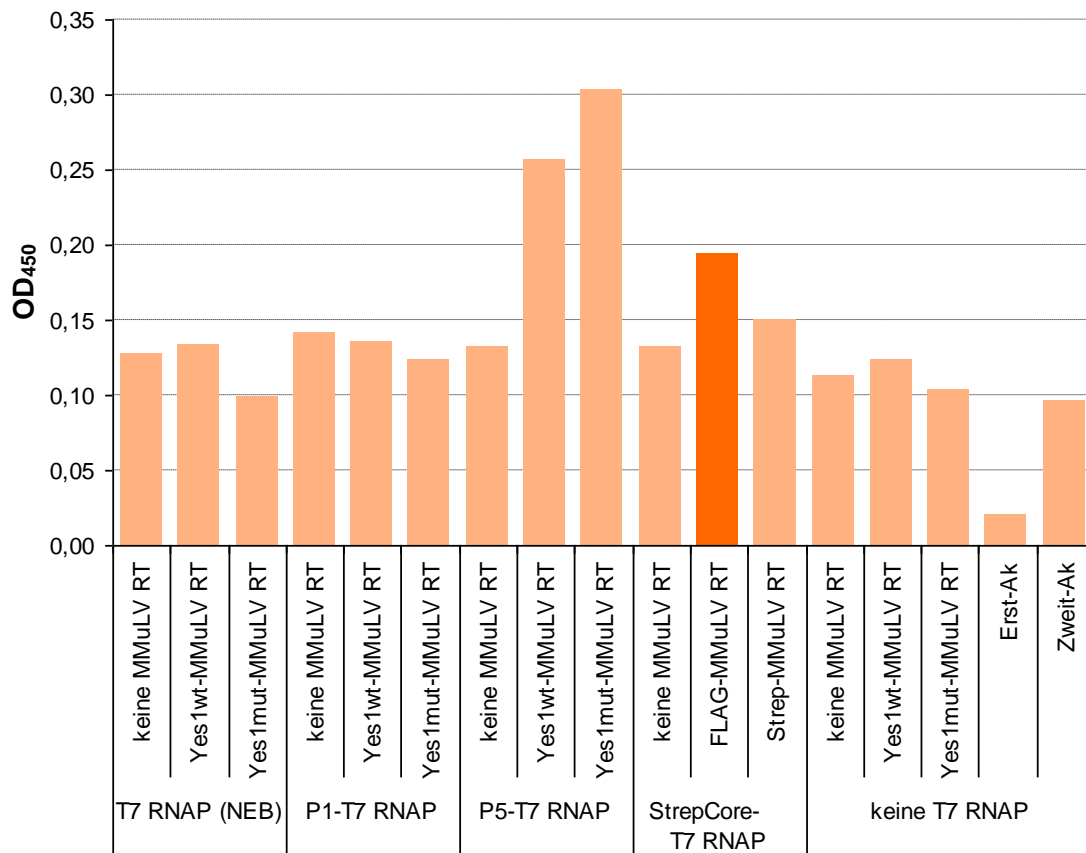


Abb. 47: Affinitäten der einzelnen T7 RNAP- und MMuLV RT-Varianten zueinander

Für den ELISA wurden 50 ng der angegebenen T7 RNAP jeweils in einer Vertiefung einer MaxiSorp-Platte (Nunc) immobilisiert und mit 5 ng der angegebenen MMuLV RT inkubiert. Nachweissystem: Kaninchen-anti-MMuLV RT-Serum und Ziege-anti-Kaninchen-HRP. Als Negativkontrollen wurden je eine Vertiefung ohne MMuLV RT, eine Vertiefung ohne Erst- bzw. ohne Zweit-Antikörper inkubiert.

3.5.8 Zusammenfassung

- * serieller Transfer der NASBA ist möglich
- * serieller Transfer des kombinierten Ansatzes ist zweimal möglich, dann stirbt die Reaktion ab
- * Mutationsrate steigt mit serielltem Transfer an
- * Auftreten von Mutations-*Hot Spots*
- * Zeit- und arbeitseffiziente Unterscheidung zwischen Yes1-MMuLV RT-Varianten bzw. FLAG- und Strep-MMuLV RT mittels *real-time* PCR
- * keine Anreicherung der Yes1mut-MMuLV RT gegenüber der Yes1wt-MMuLV RT im Evolutionsexperiment
- * keine Anreicherung der Strep-MMuLV RT gegenüber der FLAG-MMuLV RT im Evolutionsexperiment
- * T7 RNAP und MMuLV RT zeigen im ELISA bereits eine Affinität im mikromolaren Bereich zueinander

4 Diskussion

4.1 Gerichtete Evolution

Die gerichtete Evolution ist eine Methode zur Modifikation der Eigenschaften von Proteinen und Nukleinsäuren nach den Prinzipien von Darwin. Die Kombination von Mutation, Replikation und einem geeigneten Selektionsschritt ermöglicht die Optimierung von Enzymen, beispielsweise hinsichtlich Thermostabilität, katalytischer Aktivität und Substratspezifität (Turner, 2003).

Neben der Entwicklung industrieller Enzyme im Bereich der Biokatalyse, hat vor allem die Generierung von Antikörpern mit hoher Affinität, Spezifität und Stabilität im Bereich der Gen- und Pharmakotherapie an Bedeutung gewonnen. Mittels gerichteter Evolution konnten Antikörper und Antikörperfragmente hinsichtlich ihrer Affinität bis in den nanomolaren (Chames *et al.*, 2002), pikomolaren (Hanes *et al.*, 2000) und sogar femtomolaren Bereich hin optimiert werden (Boder *et al.*, 2000).

Der Prozess der gerichteten Evolution beinhaltet zunächst die Generierung einer Varianten-Bibliothek und anschließend die Identifizierung verbesserter Varianten mit einem geeigneten Selektionsverfahren. Bisherige Verfahren zur gerichteten Evolution sind durch einen hohen zeitlichen Aufwand, einen begrenzten Variantenpool und durch einen diskontinuierlichen Ablauf limitiert. Mit einem kontinuierlichen Evolutionssystem, basierend auf den drei Prinzipien von Darwin, könnten diese Limitationen umgangen werden.

4.2 Replikation

4.2.1 NASBA

Die *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) ist eine isotherme Methode zur Amplifikation von RNA-Molekülen, komplementär zum Ausgangs-Template (Compton, 1991). Die NASBA wird hauptsächlich für diagnostische Zwecke in der Human- und Tiermedizin und in der Lebensmittelkontrolle eingesetzt (Uyttendaele *et al.*, 1995; Heim & Schumann, 2002; Greene *et al.*, 2003). Die meisten Anwendungen dienen dem Nachweis von Viren und Bakterien in infektiösen Proben (Cook, 2003; Sugiyama *et al.*, 2003; Guichón *et al.*, 2004). Ein Großteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung der NASBA zur Amplifikation von DNA-Molekülen mit einer Länge größer als zwei Kilobasen. Im Einklang mit Literaturdaten zeigte sich, dass die NASBA-Amplifikation von DNA-Templates im Vergleich zu RNA-Molekülen weniger effizient ist. Die Menge an RNA-Amplifikationsprodukt ist nach einer 90-minütigen NASBA ungefähr 20-fach höher als die Menge an amplifizierter DNA (Sooknanan *et al.*, 1995). Die exponentielle Amplifikationsrate der NASBA basiert hauptsächlich auf der Aktivität der T7 RNA Polymerase, die ausgehend von einem (c)DNA-Molekül mit T7 Promotor eine Vielzahl an mRNA-Molekülen generiert (Milligan *et al.*, 1987). Anschließend werden die mRNA-Moleküle durch die Aktivität einer Reversen Transkriptase in cDNA-Moleküle umgeschrieben (Temin & Mizutani, 1970). Dieser Schritt trägt aber nicht zur Vervielfachung der Nukleinsäuren bei, er

dient vielmehr dem Anfügen der T7 Promotor-Sequenz, um erneut transkribierbare Moleküle für den Amplifikationsprozess bereit zu stellen.

Der Einbau des *Forward*-Primers, der die T7 Promotor-Sequenz kodiert, stellt somit einen kritischen Schritt in der NASBA dar. Der Einsatz von biotinylierten Primern in der NASBA und die anschließende Analyse des NASBA-Produkts mittels Southern Blot zeigten, im Einklang mit Sooknanan *et al.* (1995), dass der *Forward*-Primer um ein Vielfaches ineffizienter eingebaut wird als der *Reverse*-Primer. Weiterhin zeigte die NASBA mit biotinyliertem *Reverse*-Primer, dass die Reverse Transkription mit der MMuLV RT zu einem nicht unerheblichen Anteil in cDNA-Abbruchfragmenten resultiert. Laut Literatur kann der Anteil an cDNA-Abbruchfragmenten bis zu 50% betragen (Berger *et al.*, 1983). Dieser Effekt ist zum einen auf die träge Polymerase-Aktivität der MMuLV RT und zum anderen auf ihre Tendenz zum Pausieren an RNA-Regionen mit ausgeprägten Sekundärstrukturen zurückzuführen (Gerard *et al.*, 1989). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die RNase H-Aktivität den RNA-Anteil des RNA/DNA-Hybrids zu nah am wachsenden cDNA-Molekül hydrolysiert und dadurch einen vorzeitigen Abbruch der Erststrangsynthese verursacht (Berger *et al.*, 1983). Ohne Hybridisierungsbereich für den *Forward*-Primer am 3'-Ende des Erststranges kann die Zweitstrangsynthese nicht initiiert werden.

Aufgrund der geringen Effizienz beim *Forward*-Primer Einbau ist die Sensitivität der NASBA, die mit DNA-Template gestartet wird, limitiert. Voisset *et al.* (2000) beschreiben, dass die NASBA als Ausgangs-Templatekonzentration 10.000 DNA-Moleküle im Vergleich zu zehn RNA-Molekülen pro Reaktionsansatz benötigt, um ein mittels ELOSA detektierbares Signal zu ergeben. Die geringe Sensitivität gegenüber DNA-Molekülen wird beim Nachweis viraler RNA in der klinischen Diagnostik ausgenutzt. So können RNA-Moleküle auch vor dem Hintergrund genomischer DNA spezifisch amplifiziert werden (Compton, 1991). Auch bei der Detektion von Hepatitis A-Virus zeigte die NASBA im Vergleich zur RT-PCR eine zehnfach höhere Sensitivität (Jean *et al.*, 2001). Literaturbekannte Einflussmöglichkeiten zur Optimierung des *Forward*-Primers sind der GC-Gehalt und die Länge des hybridisierenden Bereichs (Deiman *et al.*, 2002). Zur Amplifikation des Renilla-Templates mittels NASBA wurden in dieser Arbeit Primervarianten mit verschiedenen langen Hybridisierungsbereichen getestet. Dabei zeigte die Primervariante mit einem 18 Nukleotide langen Hybridisierungsbereich das stärkste Amplifikationssignal. Primervarianten mit längerem oder kürzerem Hybridisierungsbereich führten zu schwächeren Amplifikationsraten und geringeren Mengen an NASBA-Produkt.

Um die Limitationen des Reverse Transkriptase-Schrittes in der NASBA zu optimieren, wurde eine Vielzahl von Additiven, die vor allem im Bereich der RT-PCR eingesetzt werden, untersucht. Der von Nakahara *et al.* (1998) beschriebene Anstieg an NASBA-Produkt, durch Zugabe von Inosintriphosphat, konnte nicht bestätigt werden. Die Verwendung eines NTP-Analogons bei der Kombination von NASBA und *in vitro* Proteinsynthese würde jedoch höchstwahrscheinlich zu ungewollten Unregelmäßigkeiten bei der Translation führen. Laut Literatur ermöglichen DNA-Einzelstrangbindende Proteine, SSBP und T4 *Gene* 32, eine erhöhte Prozessivität der Reversen Transkriptase, indem sie den Einzelstrang stabilisieren

(Villalva *et al.*, 2001; Davydova & Rothman-Denes, 2003). Dieser Effekt konnte im Kontext der NASBA nicht bestätigt werden.

DMSO, ein Sekundärstruktur-reduzierendes Agens, wird standardmäßig in einer Konzentration von 15% in der NASBA und häufig in der PCR zur Amplifikation GC-reicher Templates eingesetzt (Kievits *et al.*, 1991; Varadaraj & Skinner, 1994). Für die Kombination der NASBA mit einem *in vitro* Proteinsynthesesystem musste aber auf DMSO in der Reaktion verzichtet werden, da DMSO bereits ab einer Konzentration von fünf Prozent zur Inhibierung der *in vitro* Proteinsynthese führte. Die Inhibierung der Translation durch DMSO ist auf die Zerstörung der Polyribosomen-Struktur zurückzuführen (Saborio & Koch, 1973). In der NASBA ergab die Reduktion der DMSO-Konzentration von 15% auf 10% bereits einen drastischen Abfall der Amplifikationseffizienz. Um mit einer DMSO-freien NASBA dennoch ein detektierbares Amplifikationssignal zu erreichen, wurden die Inkubationszeit und die Template-Ausgangskonzentration entsprechend optimiert. Ein weiteres Additiv für die RT-PCR ist Betain. Mit seiner destabilisierenden Wirkung auf RNA-Sekundärstrukturen ermöglicht Betain die RT-PCR-Synthese zwölf Kilobasen langer cDNA-Moleküle (Spiess & Ivell, 2002) und führte im Einklang mit den Literaturdaten in der DMSO-freien NASBA ebenfalls zu einer effizienteren Amplifikation.

Bei der Wahl der Reversen Transkriptase für die NASBA wurden, neben der DNA-Amplifikationsrate, die Aktivität der intrinsischen RNase H und die Proteinstruktur berücksichtigt. Die am häufigsten in der NASBA verwendete Reverse Transkriptase stammt aus dem *Avian myeloblastosis virus* (AMV RT) (Compton, 1991). Die Proteinstruktur der AMV RT wird als Heterodimer, bestehend aus einer Polymerase- und einer RNase H-Domäne, beschrieben (Grandgenett *et al.*, 1973, 1985). Alternativ kann die NASBA mit der *Moloney murine leukaemia virus* Reversen Transkriptase (MMuLV RT), bei der beide Domänen als Monomer vorliegen (Roth *et al.*, 1985; Tanese & Goff, 1988), durchgeführt werden. Eine modifizierte Version der MMuLV RT, ohne interferierende RNase H-Domäne, wird für die Synthese besonders langer cDNA-Moleküle beschrieben (Kotewicz *et al.*, 1988). Aufgrund der höheren Thermostabilität im Vergleich zur MMuLV RT (Gerard *et al.*, 2002), können mit der MMuLV RT (minus RNase H) bei höheren Reaktionstemperaturen RNA-Moleküle mit schwer zugänglichen Sekundärstrukturen effizienter revers transkribiert werden (Gerard *et al.*, 1989). Da im zu etablierenden Evolutionssystem die NASBA mit einem *in vitro* Proteinsynthesesystem kombiniert wird, muss die Reverse Transkription bei physiologischen Reaktionstemperaturen um 37°C ablaufen.

In der NASBA zeigte die MMuLV RT, im Gegensatz zur AMV RT und MMuLV RT (minus RNase H), eine zur DNA-Amplifikation ausreichende, intrinsische RNase H-Aktivität. Dies brachte zum einen den Vorteil mit sich, dass im Reaktionssystem statt drei nur zwei funktionelle Enzyme vorliegen müssen. Ferner ist die *in vitro* Proteinexpression einer aktiven Reversen Transkriptase in Form eines Monomers, wie im Falle der MMuLV RT, bedeutend unkomplizierter im Vergleich zur heterodimeren Form der AMV RT. Somit wurde die MMuLV RT die Reverse Transkriptase der Wahl.

Die Optimierung der NASBA - hinsichtlich Inkubationstemperatur und -zeit, verwendeter Reverser Transkriptase und Additiven, sowie eingesetzter Template-Konzentration -

ermöglichte die Amplifikation von DNA-Molekülen bis zu einer Länge von 3,2 kb. Die Amplifikation von DNA-Templates größer als zwei Kilobasen war insofern obligat, als dass im Evolutionssystem die 2,5 kb lange, kodierende Sequenz der MMuLV RT in Fusion mit einem Bindepartner repliziert werden soll.

Allein zur Amplifikation von DNA-Molekülen wäre die NASBA nicht die Methode der Wahl. Mittels PCR können DNA-Moleküle um den Faktor $2,2 \times 10^5$ amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1985). Der Anfangs-Denaturierungsschritt, die hohen Temperaturoptima der DNA-Polymerasen und die jeweils angepasste Temperatur zur Primeranlagerung ergeben optimale Bedingungen für die Reduktion von DNA-Sekundärstrukturen, die Primer-Hybridisierung und damit für die exponentielle DNA-Amplifikation innerhalb kurzer Zeit.

Im Gegensatz zur PCR ist jedoch mit der NASBA die isotherme Amplifikation von DNA-Molekülen bei physiologischen Inkubationstemperaturen ($\sim 37^\circ\text{C}$) und somit die Kombination mit einem *in vitro* Proteinsynthesesystem realisierbar.

4.2.2 Kombination NASBA und *in vitro* Proteinsynthese

Für die *in vitro* Proteinsynthese war, aufgrund des einfachen Herstellungsverfahrens, der einfachen Manipulation (Betton, 2003) und einer im Vergleich zu eukaryotischen Systemen hohen Expressionsrate (Hino *et al.*, 2008), zunächst ein *E. coli*-basiertes System angedacht. Es zeigte sich aber, dass *E. coli* Lysate bereits ab einer Konzentration von einem Prozent die DNA-Amplifikation während der NASBA inhibierten. Verschiedene Ansätze zur Identifizierung der inhibierenden Komponente wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Der von Ma & Crouch (1996) beschriebene Effekt, einer Inhibierung der Reversen Transkriptase durch die *E. coli* eigene RNase HI, konnte durch die Verwendung eines Lysats aus einem RNase HI deletierten *E. coli*-Stamm nicht aufgehoben werden. Laut Literatur ist bekannt, dass die *E. coli* DNA Polymerase I als Enzym für die Zweitstrangsynthese (Gubler & Hoffman, 1983) bzw. als Inhibitor der Reversen Transkriptase (Arezi & Hogrefe, 2007) fungieren kann. Bei Verwendung der *E. coli* DNA Polymerase I in der NASBA konnte weder ein förderlicher, noch ein inhibierender Effekt beobachtet werden. Da eukaryotische *in vitro* Proteinexpressionssysteme (Weizenkeim- und Kaninchenretikulozyten-Lysat) und das rekombinant hergestellte PURE System, das alle essentiellen *E. coli* Translationskomponenten enthält, keinen Inhibierungseffekt auf die NASBA zeigten, musste es sich um einen *E. coli*-Zellbestandteil handeln, der nicht essentiell für die Proteinexpression war. In dieser Arbeit konnte die inhibitorische Wirkung des *E. coli* Lysats auf eine denaturierbare Komponente, die in geringen Mengen im *E. coli* Lysat enthalten ist und mit den Ribosomen assoziiert vorliegt, eingeschränkt werden.

Das PURE System enthält, neben allen zur Translation benötigten *E. coli* Komponenten, die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus dem T7 Phagen (T7 RNAP) und ermöglicht dadurch die Kopplung der *in vitro* Translation mit der Transkription (Shimizu *et al.*, 2001). Die T7 RNAP besitzt eine bis zu achtfach höhere Transkriptionsrate im Vergleich zur *E. coli* eigenen DNA-abhängigen RNA-Polymerase (Iost *et al.*, 1992). In dem zu etablierenden Evolutionssystem soll die Transkription mit einer T7 RNA Polymerase in Fusion mit einem der beiden Bindepartner

stattfinden. Verschiedene Expressions- und Aktivitätstests ergaben, dass eine C-terminale Fusion zur Inaktivierung der T7 RNAP führt, und dass Fusionen am N-Terminus keinen negativen Einfluss auf die Aktivität haben. Eine hoch aktive T7 RNAP in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem kann sich aber auch nachteilig äußern. Die *in vivo* Transkriptionsrate der *E. coli* RNA-Polymerase beträgt 20 – 60 Nukleotide pro Sekunde und die Proteinsyntheserate der Ribosomen maximal 21 Aminosäuren pro Sekunde (Bremer & Dennis, 1987). Die Synchronisation beider Reaktionen unterbindet die überflüssige mRNA-Synthese bei Aminosäure-Mangel und den Abbau ungeschützter mRNA-Moleküle (Belasco & Higgins, 1988; Richardson, 1991). Da die T7 RNAP mit einer Transkriptionsrate von circa 200 – 300 Nukleotiden pro Sekunde arbeitet (Iost *et al.*, 1992), kommt es *in vitro* zur Entkopplung von Transkription und Translation, dadurch zur Anhäufung instabiler mRNAs und zu einer Reduktion der Proteinexpression (Iost & Dreyfus, 1995). Im Einklang zur Literatur konnte, bei der Bestimmung der optimalen Template-Menge im PURE System, ab 20 ng/μL DNA-Template eine Reduktion der Proteinexpression beobachtet werden, die auf die Diskrepanz zwischen mRNA- und Protein-Syntheseraten bei erhöhten Template-Mengen (> 17 ng/μL) zurückzuführen ist (Köhler *et al.*, 1996).

Weiterhin sind in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem die Magnesium- und Kaliumkonzentrationen für eine optimale Proteinexpression sehr kritisch (Craig *et al.*, 1992). Vor allem der Konzentrationsbereich der Magnesiumionen ist für eine optimale Translation sehr eng gefasst und für jedes RNA-Transkript individuell (Tse & Taylor, 1977; Jackson & Hunt, 1983). Die Konzentration an freien Magnesiumionen ist dabei abhängig von der Konzentration an freien Nukleotiden im System. Die Magnesium- und rNTP-Konzentrationen in kommerziell erhältlichen, gekoppelten Transkriptions-/Translationssystemen sind auf eine optimale Proteinexpression eingestellt. Bei der Kombination von *in vitro* Proteinsynthese und NASBA verursachen die, zur Reversen Transkription benötigten, Desoxyribonukleotide eine Verschiebung der optimalen Magnesiumionenkonzentration. Bereits die Zugabe von drei millimolar dNTPs zu einem *in vitro* Proteinsynthesesystem (PURE System) verursachte die komplette Inhibierung der Proteinexpression. Mit einer leicht erhöhten Mg^{2+} -Konzentration (22 mM) und einer schrittweisen Erhöhung der dNTP-Konzentration (auf 10 mM gesamt) konnten die DNA-Amplifikation mittels NASBA und die *in vitro* Proteinsynthese mit dem PURE System erstmals in einem gemeinsamen Reaktionsansatz realisiert werden.

Das NASBA-Produkt wird im Vergleich zum DNA-Template weniger effizient translatiert. Grund hierfür ist zum einen der ineffiziente Einbau des *Forward*-Primers, der im 5'-Bereich die T7 Promotor-Sequenz kodiert. Zum anderen verursachen die, mittels T7 RNAP und MMuLV RT eingebrachten, Substitutionen und Deletionen eine Verschiebung des offenen Leserahmens, so dass das NASBA-Produkt teilweise für nicht-funktionelles Protein kodiert. Weiterhin kann die Beschaffenheit des NASBA-Produkts angeführt werden, das wahrscheinlich nicht als doppelsträngiges DNA-Molekül, sondern vielmehr als RNA/DNA-Hybrid vorliegt. Die RNase H-Aktivität der MMuLV RT ist bei der cDNA-Synthese für den vollständigen Verdau des RNA-Anteils im RNA/DNA-Hybrid verantwortlich (Gilboa *et al.*, 1979). Bei der Erststrangsynthese können, in Abhängigkeit von der RNase H-Aktivität, RNA-Segmente zurückbleiben, die dann zu

einem späteren Zeitpunkt abgebaut oder verdrängt werden müssen (DeStefano *et al.*, 1994). Resultiert das NASBA-Produkt statt in einem doppelsträngigen DNA-Molekül in einem RNA/DNA-Hybrid (siehe Abb. 48), könnte dies sowohl die Resistenz der NASBA-Produkte gegenüber Restriktionsverdauen, als auch deren charakteristische Schmelzkurve (Daten nicht gezeigt) erklären.

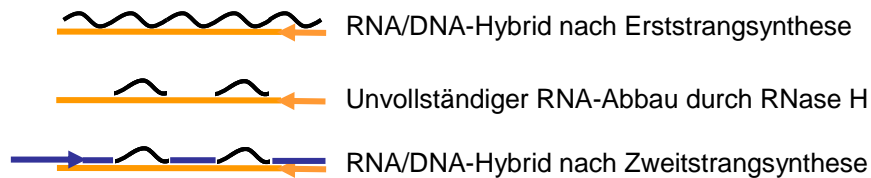


Abb. 48: Modell eines unvollständigen RNA-Abbaus während der cDNA-Synthese

Gewellte schwarze Linien stellen RNA-Moleküle bzw. RNA-Segmente dar, orange und blaue Linien stellen einen DNA-Einzelstrang dar. Orange Pfeile stehen für den *Reverse-Primer*, der blaue Pfeil für den *Forward-Primer* (mit T7 Promotor-Sequenz).

Bestrebungen, die RNase H-Aktivität der MMuLV RT mittels extrinsischer RNase H zu unterstützen, zeigten keine Wirkung auf die DNA-Amplifikationsrate bzw. auf die heterogene Zusammensetzung des NASBA-Produkts. An dieser Stelle könnten Manganionen als alternative, zweiwertige Metallionen in Betracht gezogen werden, da die RNase H-Domäne mit Mn^{2+} -Ionen eine höhere Aktivität aufweist (Blain & Goff, 1996). Auch eine RNase H-Domäne, die ohne das stark konservierte DEDD/E-Motiv im aktiven Zentrum auskommt (Kanaya *et al.*, 2010), könnte eventuell die Effizienz der NASBA steigern.

4.3 Mutation

Evolution beruht nicht allein auf der Vermehrung (Replikation) einer Spezies, sondern vielmehr auf deren gleichzeitiger Diversifizierung (Mutation). Im zu etablierenden Evolutionssystem soll parallel zur Amplifikation und Translation des DNA-Templates, die Generierung einer Variantenbibliothek stattfinden. Herkömmliche Methoden zur Generierung eines Variantenpools, ohne Kenntnis der Proteinstruktur, basieren auf der ungerichteten Mutagenese mittels *error-prone* PCR. Dabei werden mit der *Taq*-Polymerase ohne *proof-reading*-Aktivität, einem Unterschuss eines dNTPs und einer erhöhten Manganionenkonzentration Fehler in das DNA-Template eingebracht (Leung *et al.*, 1989). Die *in vitro* Evolution von Enzymen mittels *error-prone* PCR basiert in den meisten Fällen auf 2 – 7 Mutationen pro Gen (You & Arnold, 1996; Wan *et al.*, 1998; Cherry *et al.*, 1999). Die „optimale“ Fehlerrate ist immer vom Mutationsprotokoll und dem zu modifizierenden Protein abhängig, dabei können sowohl niedrige, als auch extrem hohe Fehlerraten zur Isolierung der gewünschten Enzym-Funktion führen (Arnold, 1998; Drummond *et al.*, 2005).

In der NASBA sind T7 RNAP und MMuLV RT, die beide keine *proof-reading*-Funktion besitzen, für das Einbringen von Mutationen in das DNA-Template verantwortlich. Die Mutationsrate der T7 RNAP wird mit $6 \times 10^{-5}/bp$ (Brakmann & Grzeszik, 2001) und die der MMuLV RT mit $2 \times 10^{-6}/bp$ (Varela-Echavarría *et al.*, 1992) bzw. $3 \times 10^{-5}/bp$ (Roberts *et al.*, 1988) beschrieben. In dieser Arbeit konnten, je nach verwendetem Template, Mutationsraten im NASBA-Produkt im

Bereich von $5,5 \times 10^{-5}$ /bp bis $3,4 \times 10^{-4}$ /bp und damit im Einklang mit den Literaturdaten bestimmt werden. Die MMuLV RT hat im Vergleich zu anderen Reversen Transkriptasen eine vergleichsweise hohe Mutationsrate (Stuke *et al.*, 1997). Dabei ist die Exaktheit von Reversen Transkriptasen nicht nur enzymspezifisch, sondern auch abhängig vom DNA-Template. Bei der Analyse der katalytischen Eigenschaften stellten Ricchetti & Buc (1990) fest, dass für den Einbau korrekter Nukleotide die Michaeliskonstanten der AMV RT und HIV RT im nanomolaren, hingegen für die MMuLV RT nur im mikromolaren Bereich liegen.

Für den Fall, dass die Mutationsrate für die Evolution hochaffiner Protein-Liganden nicht ausreicht, kann diese durch den Einsatz einer modifizierten T7 RNA Polymerase, die eine 20-fach höhere Substitutionsrate im Vergleich zur Wildtyp-T7 RNAP besitzt, gesteigert werden (Brakmann & Grzeszik, 2001). Weiterhin könnte das mutagene Potential von DNA-interkalierenden Agenzien - Ethidiumbromid oder SYBR Green I (Singer *et al.*, 1999) - oder die alkylierende Wirkung von Ethylmethansulfonat (Doak *et al.*, 2007) zur Steigerung der Mutationsrate ausgenutzt werden. Da in der Literatur die inhibierende Wirkung interkalierender Agenzien auf die *in vitro* Proteinsynthese beschrieben wird (Malina *et al.*, 2005), wurde auf deren Einsatz aber verzichtet. Generell können die Mutationen nicht nur im zu evolvierenden Bereich des Protein-Liganden, sondern auch im kodierenden Bereich der MMuLV RT auftreten und damit zur Generierung nicht-funktioneller oder auch höher aktiver MMuLV RT-Varianten beitragen.

Zur Akkumulation von Mutationen während der NASBA - und im weiteren Verlauf als Selektionsdruck im Evolutionssystem - sollte das Prinzip des seriellen Transfers angewendet werden. Wright & Joyce (1997) beschreiben die kontinuierliche Evolution eines katalytisch-aktiven RNA-Moleküls (Ribozym) mittels serieller Transfers. Dabei konnten sowohl die katalytische Aktivität, als auch die Amplifikationsrate des Ribozyms durch die Akkumulation von Mutationen innerhalb von 100 seriellen Transfers deutlich gesteigert werden (Wright & Joyce, 1997). Die Anwendung des seriellen Transfers im Rahmen dieser Arbeit beinhaltete, dass 50% der NASBA-Reaktionslösung nach 0,5 – 1 h Inkubationszeit auf 50% unverbrauchte NASBA-Lösung gegeben und erneut inkubiert wurden. Nur Moleküle mit einer Verdopplungszeit von 0,5 – 1 h besaßen die Möglichkeit in der transferierten Reaktionslösung erneut amplifiziert zu werden. Auf diese Weise konnte die NASBA mit dem Renilla-Template (~ 1,2 kb) mindestens 16-mal, über einen Zeitraum von acht Stunden, ohne Reduktion der Amplifikationsrate transferiert werden. Bei Anwendung des seriellen Transfers auf das 2,3 kb große MMuLV RT-Template musste die Inkubationszeit auf eine Stunde erhöht werden und der Transfer konnte nur noch sechsmal durchgeführt werden, bevor eine deutliche Reduktion des NASBA-Amplifikationssignals auftrat. Diese deutliche Limitation ist zum einen auf die Molekülart und -länge, ein bis zwei Kilobasen DNA-Template im Vergleich zum 119 Nukleotide kurzen Ribozym, und zum anderen auf den in diesem Experiment noch nicht vorhandenen Selektionsdruck zurückzuführen. Im späteren Evolutionssystem soll die Interaktion zwischen zwei Bindepartnern, jeweils an T7 RNAP bzw. MMuLV RT fusioniert, dazu führen, dass aufgrund der räumlichen Nähe das Template eines höher affinen Liganden effizienter repliziert wird. Im Experiment von Wright & Joyce (1997) konnte nur das Ribozym, das die Ligation einer

T7 Promotor-Sequenz an sein eigenes RNA-Gerüst katalysiert, nach der Reversen Transkription erneut transkribiert und damit amplifiziert werden.

Beschränkt auf eine geringere Anzahl serieller Transfers, wurden die Mutationsraten der Standard-NASBA und der seriell transferierten NASBA gegenübergestellt. Problematisch zeigte sich der deutliche Anstieg an Insertionen und Deletionen gegenüber der Anzahl an Punktmutationen. Vor allem in Adenosin- bzw. Thymidin-reichen Genabschnitten führten Insertionen und Deletionen, wahrscheinlich nach dem Streisinger *slippage*-Modell (Streisinger *et al.*, 1966), zu unerwünschten *Frameshifts* und damit zu nicht-funktionellen Leserahmen. In der Literatur ist bekannt, dass Reverse Transkriptasen in bestimmten Genabschnitten zu auffallend hohen Mutationsraten, sogenannten *Hot Spots*, tendieren. Die Mutationsrate der HIV RT kann sogar bis zu eine Mutation pro 70 Nukleotiden betragen (Roberts *et al.*, 1988). Da das Entfernen der *Hot Spots*, durch den Einbau alternativer Kodons, das erneute Auftreten von Insertionen und Deletionen nicht verhindern konnte, scheint nicht die Sequenz allein, sondern vielmehr die Sekundärstruktur der Nukleinsäuren die Ursache einer fehlerbehafteten cDNA-Synthese zu sein. Klasens *et al.* (1999) beschreiben, dass stabile RNA-*Hairpin*-Strukturen die effiziente Elongation der HIV RT behindern und zu cDNA-Abbruchfragmenten führen (Klasens *et al.*, 1999). Eine Möglichkeit, um Prozessivität und Exaktheit der MMuLV RT an komplizierten RNA-Sekundärstrukturen zu verbessern, ist die Erhöhung der Reaktionstemperatur (Malboeuf *et al.*, 2001). Für die Kombination von NASBA und *in vitro* Proteinsynthese ist eine Erhöhung der Reaktionstemperatur aber nicht möglich, da das PURE System ein Temperaturoptimum von 37°C besitzt. Im funktionellen, kombinierten System besteht aber die Möglichkeit, dass sich ein Template ohne störende Sekundärstrukturen durchsetzt oder, dass eine MMuLV RT-Variante mit optimierter Prozessivität, auch an RNA-Sekundärstrukturen, evolviert wird.

Weiterhin problematisch bei der cDNA-Synthese mit Reversen Transkriptasen ist deren einseitige Tendenz beim Einbau von Mutationen. Die von der HIV RT am häufigsten verursachten Diskrepanzen sind dGMP:T_{Template}- bzw. dGMP:A_{Template}-Mutationen (Weber & Grosse, 1989). Ferner zeigt die Arbeit von Bracho *et al.* (1998), dass DNA-Polymerasen während der *error-prone* PCR die Mutation von Adenosin- (68%) bzw. Guanodinukleotiden (15%) preferieren. Während der NASBA mit der MMuLV RT als DNA- bzw. RNA-abhängige DNA-Polymerase traten bevorzugt Mutationen von Adenosin- (47%) und Cytosin-Nukleotiden (41%) auf. Diese einseitige Nukleotid-Tendenz reduziert die Möglichkeit bestimmter Aminosäure-Substitutionen, die an bestimmten Positionen im Protein erforderlich wären, um potentiell Proteinvarianten mit der gewünschten, neuen Funktionalität zu bekommen. Die Wahrscheinlichkeit eine verbesserte Variante zu identifizieren wird maximal, wenn die Selektion auf einer maximal diversen Variantenbibliothek basiert (Patrick *et al.*, 2003). Eine „ideale“ Zufallsmutagenese, bei der alle Nukleotid-Mutationen mit nahezu identischer Wahrscheinlichkeit auftreten, wird mit der Q β -Replikase, einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase beschrieben (Kopsidas *et al.*, 2007). Auf RNA-Ebene scheinen Nukleotidsubstitutionen ohne einseitige Tendenzen aufzutreten. So verwenden Kopsidas *et al.* (2007) eine mittels Q β -Replikase generierte mRNA-Variantenbibliothek in Kombination mit dem Ribosomen-*Display* zur Evolution der Substratspezifität einer β -Laktamase. Eine Adaption der

Qß-Replikase für das zu etablierende Evolutionssystem war insofern schwierig, da die Qß-Replikase so konstruiert werden müsste, dass zwei zunächst nicht-funktionelle Teile erst durch die Interaktion der Fusionspartner aktiv werden.

Die adaptive Evolution von Proteinvarianten basiert, nach der Theorie von Levin *et al.* (2000), hauptsächlich auf Kompensations- und nicht auf Reversions-Mutationen. Untersuchungen an Streptomycin-resistenten *E. coli*-Kulturen ergaben, dass diese unter Streptomycin-freier Kultivierung zwar ihre Resistenz behalten, aber alternative Genloci hin zu einer höheren Translationseffizienz adaptieren. Laut Literatur dominieren diese Fitness-kompensierenden Mutationen zu 56,8% die seriell transferierten Bakterienkulturen (Levin *et al.*, 2000). Die bei der Mutationsanalyse in dieser Arbeit vermehrt auftretenden Substitutionen und Deletionen können als fitness-kompensierende Mutationen interpretiert werden. Eine Rasterverschiebung des offenen Leserahmens im Verlauf der Translation führt oftmals zur Termination, die fehlerhaften Proteine werden nicht synthetisiert. *E. coli*-Zellen, die ihre Ressourcen allein für die zelleigene Proteinmaschinerie und nicht für die Synthese organismusfremder Proteine verwenden können, besitzen somit einen deutlichen Wachstumsvorteil. So können bei der gerichteten Evolution, neben Proteinvarianten mit gezielt optimierten Eigenschaften, immer auch Varianten entstehen, die lediglich fitness-optimiert sind.

Einen wesentlichen Einfluss auf die Effizienz des seriellen Transfers hat die Verdünnungsrate. Eine optimale Verdünnung, bei der die Anzahl überlebender und förderlicher Mutationen maximal ist, wird mit 0,1 – 0,2 beschrieben (Wahl *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde der serielle Transfer mit einer Verdünnungsrate von 0,5 durchgeführt, da eine höhere Verdünnung ein zu starkes Ausdünnen der Template-Konzentration und damit das Absterben der Reaktion verursachte.

4.4 Selektion

Die Selektion stellt den kritischsten Schritt innerhalb eines *in vitro* Evolutionsprozesses dar. Das Aufsetzen eines geeigneten *Screening*- oder Selektionssystems ist gemäß dem ersten Gesetz der gerichteten Evolution „*You get what you screen for*“ (Frances H. Arnold) von entscheidender Bedeutung. Die Selektionsmethode sollte neben der erwünschten Zielfunktion alle weiteren essentiellen Eigenschaften des Zielmoleküls widerspiegeln, um ungewollte Nebeneffekte, beispielsweise eine niedrige Expressionsrate, zu verhindern (You & Arnold, 1996). Dabei ist die Genotyp-/Phänotyp-Kopplung eine grundlegende Voraussetzung, um am Ende des Selektionsverfahrens die optimierte Proteinvariante amplifizieren zu können.

Zellbasierte *Display*-Methoden, bei denen die Proteinvarianten auf der Oberfläche von Zellen oder Phagen präsentiert werden, sind bei der Generierung der Variantenbibliothek und der anschließenden Selektion in ihrer Variantenanzahl limitiert. Abhängig von der Klonierungs- und Transformationseffizienz können Bibliothekengrößen zwischen 10^8 – 10^{12} erreicht werden (Leemhuis *et al.*, 2005). Trotzdem übersteigen die Bibliothekengrößen oftmals die Anzahl an Proteinvarianten, die *in vivo* gescreent werden können. Während für die Diversitäten-Generierung eine Vielzahl an leicht-handhabbaren Methoden existieren, müssen die Selektionsverfahren spezifisch auf jedes Enzym und jede Reaktion neu angepasst werden. Da

die Selektionsverfahren zellbasierter *Display*-Methoden unter Konditionen ablaufen müssen, die von lebenden Zellen toleriert werden, ist zum einen der dynamische Bereich eingeschränkt, zum anderen treten häufig Probleme mit toxischen Proteinen auf (Leemhuis *et al.*, 2005). Kolorimetrische oder fluoreszenz-basierte Analysemethoden ermöglichen das Screenen von $10^5 - 10^6$ Varianten am Tag, Aktivitätstests im Mikrotiterformat sind hingegen auf $10^3 - 10^4$ Varianten/Tag limitiert (Turner, 2003). *In vitro Display*-Methoden, bei denen beispielsweise die translatierten Polypeptide direkt mit der kodierenden Nukleinsäure gekoppelt werden (Mattheakis *et al.*, 1994; Roberts & Szostak, 1997), bieten die Möglichkeit stringenterer Selektionsbedingungen (extreme pH-Werte und Temperaturen, Einbau unnatürlicher Aminosäuren (Mendel *et al.*, 1992)) und umgehen damit die meisten Limitationen zellbasierter Methoden. Unabhängig von limitierenden Transformationseffizienzen können *in vitro* größere Variantenbibliotheken generiert werden, die bis zur physikalisch-möglichen Grenze von DNA in Lösung und damit, abhängig vom Gen, mehr als 10^{15} Moleküle enthalten können (Leemhuis *et al.*, 2005).

Das zu etablierende Evolutionssystem besitzt das Potential zur Variantenanzahl-unabhängigen Selektion höher affiner Proteinvarianten. Basierend auf der Affinität zweier Interaktionspartner zueinander, sollen höher affine Proteinvarianten in die räumliche Nähe zu ihrem mRNA-Template gelangen. Damit ist die Genotyp-/Phänotyp-Kopplung, ähnlich zur *in vitro compartmentalisation* (IVC; Tawfik & Griffiths, 1998), durch die räumliche Nähe von Proteinvariante und kodierender Gensequenz gegeben. Im Gegensatz zur IVC, bei der eine vorab generierte Gen-Bibliothek in ein *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem eingebracht wird, ermöglicht die Kombination von NASBA und PURE System die simultane Variantengenerierung und *in vitro* Translation.

Der Selektionsschritt im zu etablierenden Evolutionssystem basiert ebenfalls auf der Affinität zweier Interaktionspartner zueinander. Dabei liegt der zu evolvierende Bindepartner als Fusion mit der MMuLV RT vor, der entsprechende Interaktionspartner als Fusion mit der T7 RNAP. Je nach Affinität der Bindepartner zueinander, soll das MMuLV RT-Fusionsprotein in die räumliche Nähe seines eigenen mRNA-Templates (das gleichfalls für den hochaffinen Bindepartner kodiert) gelangen und dieses bevorzugt revers transkribieren. Aufgrund der verstärkten Replikationsrate käme es zu einer Anreicherung des höher affinen Protein-Liganden und damit zu dessen Selektion.

Die SH3-Domäne Yes1 und ein PxxP-Motiv des 68 kDa großen Sam68-Proteins (P5; Asbach, 2010) wurden als Test-Interaktionspaar mit moderater Bindungsaffinität im mikromolaren Bereich ausgewählt. Scr-Homologie 3 (SH3)-Domänen sind konservierte Proteinmodule mit einer Länge von 50 – 70 Aminosäuren, die vor allem bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. SH3-Domänen bevorzugen Peptidliganden mit einer speziellen Sequenzcharakteristik, beispielsweise dem sogenannten PxxP-Konsensusmotiv (Sparks *et al.*, 1996). Die schwache Interaktion im mikromolaren Bereich ist unter bestimmten Umständen von Vorteil. So begünstigt die schnelle Bildung und Auflösung von Signalkomplexen in einer Zelle den dynamischen Fluss makromolekularer Verbindungen (Li, 2005). In der AG Wagner (Universitätsklinikum Regensburg) konnte mittels Phagen-*Display* eine Variante der SH3-

Domäne Yes1 identifiziert werden (Yes1mut), die im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Yes1wt) eine 67-fach höhere Affinität zum PxxP-Motiv P5 besitzt (Kellner, 2007). Im kombinierten Ansatz aus NASBA und PURE Δ T7 RNAP System sollte, aus einer Mischung beider Yes1-Varianten, die Yes1mut-Variante aufgrund ihrer 67-fach höheren Affinität zum P5-Motiv stärker repliziert werden und sich im Vergleich zur Yes1wt-Variante im System anreichern. Dass entgegen den Erwartungen keine Anreicherung der Yes1mut-Variante detektiert wurde, könnte an einem nicht ausreichend signifikanten Affinitätsunterschied zwischen den beiden Yes1-Varianten im Bezug auf das P5-Motiv liegen, um unter den angewandten Reaktionsbedingungen einen Selektionsvorteil zu bieten.

Weiterführende Studien zur Bindungsaffinität zwischen T7 RNAP- und MMuLV RT-Varianten brachten interessanterweise hervor, dass beide Proteine auch ohne fusionierten Interaktionspartner bereits miteinander wechselwirken. Da die Affinität der beiden Proteine zueinander, ebenso wie die Affinität der SH3-Domänen zu ihren Liganden, im mikromolaren Bereich liegt (Mayer, 2001), kann eine Interaktion der beiden Fusionspartner zunächst keinen Selektionsvorteil im Evolutionssystem mit sich bringen. Auch die von Kellner (2007) beschriebene 67-fach höher affine Yes1mut-Variante zeigte als Fusion an die MMuLV RT und unter den angewandten Reaktionsbedingungen nur noch eine zur Yes1wt vergleichbare Affinität zum P5-Motiv.

Als alternatives Interaktionspaar wurde die Streptavidin-Variante „StrepCore13-139“ (Sano *et al.*, 1995) zusammen mit dem Strep-Tag II (Schmidt *et al.*, 1996) ausgewählt. Der Strep-Tag II bindet mit einer $K_d \sim 13 \mu\text{M}$ an das StrepCore13-139 und besetzt dabei die gleiche Bindungstasche wie Biotin, allerdings dringt das voluminösere Peptid weniger tief in die Tasche ein (Schmidt *et al.*, 1996; Voss & Skerra, 1997). Der Strep-Tag II wurde als Fusion mit der MMuLV RT, das StrepCore13-139 als Fusion mit der T7 RNAP in kombinierte Ansätze aus NASBA und PURE Δ T7 RNAP System eingesetzt. Dabei konnte gegenüber einer nicht-bindenden Kontrolle, der MMuLV RT mit FLAG-Tag, keine Anreicherung detektiert werden. Ferner zeigten die FLAG- und Strep-MMuLV RT im ELISA ebenfalls unspezifische Wechselwirkungen zur T7 RNAP unabhängig von einem vorhandenen Fusionspartner. Da mit den bisher getesteten Interaktionspaaren keine ausreichend distinkte Affinität mittels ELISA nachgewiesen werden konnte, ist die Anreicherung eines theoretisch höher affinen Bindepartners im Evolutionssystem zunächst einmal nicht möglich. An dieser Stelle sollte ein alternatives Interaktionspaar mit höherer Affinität, eine alternative Reverse Transkriptase und/oder eine mittels gerichteter Evolution modifizierte MMuLV RT, die weniger unspezifisch wechselwirkt, angedacht werden.

4.5 Das *in vitro* Evolutionssystem: Limitationen und Chancen

Die gerichtete Evolution ist eine weit verbreitete Methode, um Eigenschaften von Proteinen und Nukleinsäuren zu modifizieren. Im Bereich der Biokatalyse wurde bereits eine Vielzahl an Enzymen mit neuen katalytischen Fähigkeiten generiert (Turner, 2003). Auch für die Erforschung neuartiger und/oder verbesserter Therapeutika werden die Methoden der gerichteten Evolution erfolgreich angewendet (Hida *et al.*, 2007). Nach der Theorie von Darwin

basiert Evolution auf den drei Prinzipien: Mutation, Selektion und Replikation. In der Praxis beinhaltet *in vitro* Evolution die folgenden vier Schritte: Generierung einer Diversität (meistens auf DNA-Ebene), Genotyp-/Phänotyp-Kopplung, Anwendung eines geeigneten Selektionsdruckes und letztendlich die Amplifikation und Charakterisierung der selektierten Varianten (Bradbury, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein *in vitro* Evolutionssystem etabliert werden, mit dem diese vier Schritte in Form eines kontinuierlichen, gerichteten Verfahrens zur Generierung hochaffiner Protein-Liganden kombiniert werden. Interessant sind dabei vor allem, die kontinuierliche Form des Evolutionsprozesses, die potentiell erreichbare Variantenvielfalt und die damit einhergehende Zeitersparnis gegenüber bereits etablierten Methoden.

Herkömmliche Methoden beinhalten immer die Generierung einer Variantenbibliothek, deren anschließende Translation in die entsprechende Proteinbibliothek und einen Selektionsschritt zur Identifizierung der verbesserten Varianten.

Natürliche Evolution beruht aber nicht allein auf der Generierung einer Vielzahl von Varianten und deren anschließender Selektion, sondern vielmehr auf der schrittweisen Optimierung einer Variante unter vorgegebenen Bedingungen. Dabei finden kontinuierlich, über mehrere Zyklen bzw. Generationen, aufeinander aufbauende Mutations- und Selektionsschritte statt. Diese Evolutionsschritte lassen sich in Form eines Höhe-Distanz-Diagramms, einer sogenannten *fitness landscape*, visualisieren (Wright, 1932). Dabei besitzt jeder Genotyp/Phänotyp in Abhängigkeit von seiner Replikationsrate (*fitness*) eine entsprechende Peakhöhe. Je größer die *fitness* einer Variante, desto höher ihr Peak. Evolvierende Varianten bewegen sich aber nicht immer entlang eines stetig ansteigenden Pfades, sondern können auch über energetisch weniger sinnvolle Pfade den gewünschten Zustand erreichen (Reetz & Sanchis, 2008). Mit einem Evolutionssystem, das solche kumulativen Mutationsschritte ermöglicht, sollte der natürliche Evolutionsprozess *in vitro* weitreichender und effizienter imitiert werden können.

Die von Reetz *et al.* (2005) etablierte Methode der *Combinatorial Active-Site Saturation* verfolgt eine Strategie, die zwar stark an den natürlichen Evolutionsprozess angelehnt, aber sehr arbeits- und zeitaufwendig ist. Nach ausführlicher Analyse des zu modifizierenden Proteins und seiner Bindungsstellen, wird auf relevante Domänen eine Sättigungsmutagenese angewandt und die resultierenden Varianten hinsichtlich neuer Funktionalitäten gescreent. Eine verbesserte Variante wird anschließend an einer weiteren, relevanten Domäne erneut mutiert und gescreent. Mit diesem Prozess konnten Reetz *et al.* (2006) über fünf Zwischenstufen und 120 mögliche Entwicklungskurven eine enantioselektive Epoxid-Hydrolase generieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte, simultane Variantengenerierung und *in vitro* Translation stellt die grundlegende Voraussetzung für ein kontinuierliches Evolutionssystem dar. Noch ist das System insofern limitiert, als dass die Effizienz der NASBA die Kontinuität der Reaktion begrenzt, und dass ein geeigneter Selektionsschritt innerhalb des Systems etabliert werden muss. So konnte bei kombinierten Ansätzen von NASBA und PURE System bereits nach zweimaligem Transfer eine deutliche Reduktion, sowohl der exprimierten Proteinmenge, als auch des NASBA-Produkts beobachtet werden. Dies kann entweder darauf zurückgeführt werden, dass die Units an endogen exprimierter MMuLV RT für den Reverse Transkriptase-

Schritt nicht ausreichend waren, oder dass die Mindestmenge an DNA-Template bzw. NASBA-Produkt für eine effiziente *in vitro* Translation unterschritten wurde. Da die Zugabe exogener MMuLV RT keine gesteigerte Anzahl möglicher serieller Transfers bedeutete, wird davon ausgegangen, dass die Menge an translatierbarem NASBA-Produkt nicht ausreichend war.

Weiterhin problematisch ist die zeitliche Entkopplung von Transkription und Translation, während der *in vitro* Proteinsynthese, aufgrund der hohen T7 RNAP-Aktivität (Iost *et al.*, 1992). Dies bedeutet für das Evolutionssystem, dass zunächst eine Vielzahl an mRNAs transkribiert wird, die dann zeitlich verzögert in das entsprechende MMuLV RT-Fusionsprotein translatiert werden. Bei der Translation auftretende Polyribosomen-Komplexe können durch ihre Bindung an die mRNA die Anlagerung der NASBA-Primer und die Reverse Transkription stören. Polysomen-mRNA-Komplexe dienen im Verhältnis zu frei vorliegenden Ribosomen bei der Genexpressionsanalyse als Maß für die Translationsaktivität eines Gens (Johannes *et al.*, 1999; del Prete *et al.*, 2007). Die Interaktion beider Bindepartner kann nach vollendeter Translation eventuell keine räumliche Nähe zwischen MMuLV RT-Fusionsprotein und kodierendem RNA-Template mehr gewährleisten. Mit höherer Wahrscheinlichkeit würde die MMuLV RT dann eine zufällig in der Nähe befindliche mRNA bevorzugt revers transkribieren.

Die erfolgversprechendste Vorgehensweise eine Selektion innerhalb des kombinierten Ansatzes aus NASBA und PURE System zu ermöglichen, wäre die Etablierung eines Minimal-Systems, bei dem einzelne Komponenten, wie T7 RNAP und Ribosomen, stark verdünnt vorhanden wären. Bei einem solchen System ist das größte Problem aktuell die Handhabung der entstandenen DNA-Varianten, da eine DNA-Amplifikation aus dem PURE System mittels PCR extrem ineffizient verläuft und das Detektionslimit schnell unterschritten wird. Mit einer effizienteren Detektion des entstandenen NASBA-Produkts stünde ein neues kontinuierliches Evolutionssystem mit hohem Potential für weitere Optimierungen zur Verfügung.

4.6 Ausblick

In den kommenden Jahren wird bei der Generierung neuer Therapeutika, Diagnostika und im Bereich der Biokatalyse und Feinstchemikaliensynthese die gerichtete Evolution als effiziente, energiesparende und umweltfreundliche Methode intensiver genutzt werden. Momentan existierende Methoden werden der Evolution *in vitro* durch ihre eingeschränkte Variantenvielfalt und Kontinuität nicht gerecht. Mit der in dieser Arbeit erstmals gezeigten, funktionellen Kombination einer fehlerbehafteten DNA-Amplifikationsmethode mit einem *in vitro* Proteinsynthesystem können simultan Gen-Variantenbibliotheken generiert und in die entsprechenden Proteinvarianten translatiert werden. Der noch zu etablierende Selektionsschritt sollte dann die Evolution von Protein-Liganden hinsichtlich ihrer Affinität zu einem Bindepartner kontinuierlich, ohne Einschränkung der Variantenanzahl, ermöglichen und damit den natürlichen Evolutionsprozess weitestgehend imitieren.

Die Kombination aus NASBA, als fehlerbehafteter DNA-Amplifikationsmethode, und PURE System, einem *in vitro* Proteinsynthesystem, ist funktionell, bedarf aber weiterer Optimierung. Da das kommerziell erhältliche PURE System kaum Optimierungsmöglichkeiten bietet, sollte ein eigens präpariertes *E. coli* Lysat für die *in vitro* Translation verwendet werden. Neben einem deutlich reduzierten Kostenaufwand, wäre dann die Anpassung weiterer Parameter (Puffer-, Salz- und Ribosomenkonzentrationen) möglich. Verschiedene *E. coli* Lysate und Ribosomenfraktionen wurden bereits auf ihre Kompatibilität in der NASBA getestet, zeigten aber durchweg eine hemmende Wirkung auf die NASBA - wahrscheinlich auf den Reverse Transkriptase-Schritt. Eine Reverse Transkriptase aus dem *E. coli* Bakteriophagen der P2-Familie (Odegrip *et al.*, 2006), die natürlicherweise in *E. coli*-Zellen aktiv ist, könnte eine funktionelle NASBA auch in einem *E. coli* Lysat ermöglichen. Nach Identifikation der inhibierenden Komponente im *E. coli* Lysat sollte eine Abreicherung derselben möglich sein. Weitere Inhibierungseffekte, aufgrund von *E. coli*-Zellbestandteilen, könnten mit den erst kürzlich von George Church entwickelten, komplett synthetischen Ribosomen (Harvard University, 2009) umgangen werden.

Um generell die Effizienz der Proteinsynthese zu steigern, könnte eine geringer aktive T7 RNA Polymerase verwendet werden, mit der eine stringendere Kopplung von Transkription und Translation *in vitro* eventuell möglich ist.

Die Mutationsraten der NASBA alleine, und in Kombination mit dem PURE System, wurden in dieser Arbeit bereits verifiziert. Die Mutationsrate könnte zusätzlich ungerichtet durch den Einsatz mutagener Agenzien gesteigert werden (French *et al.*, 2006). Tendenziell häufiger auftretende Substitutionen und Deletionen ließen sich durch die Verwendung einer modifizierten T7 RNA Polymerase (Brakmann & Grzeszik, 2001) zu Gunsten von Punktmutationen reduzieren.

Die größte Limitation des *in vitro* Evolutionssystems stellt momentan die unspezifische Wechselwirkung der MMuLV RT mit der T7 RNAP dar. Damit der Selektionsschritt auf der Affinität zweier Fusionspartner zueinander beruht, könnte entweder eine alternative Reverse Transkriptase eingesetzt werden oder die Oberflächenstruktur der MMuLV RT insofern

verändert werden, dass sie weniger unspezifische Wechselwirkungen verursacht. Auch wäre eine alternative Amplifikationstechnik, beispielsweise die *Helicase-Dependent Amplification* (HDA, biohelix), denkbar. Dabei ermöglicht die DNA-entwindende Eigenschaft einer Helikase in Kombination mit einer DNA-Polymerase die isotherme Amplifikation von Nukleinsäuren.

Trotz derzeitiger Limitationen besitzt das *in vitro* Evolutionssystem das Potenzial zur Generierung hochaffiner Protein-Liganden. Die in dieser Arbeit geschaffenen, grundlegenden Voraussetzungen sollten durch weiterführende Studien um einen geeigneten Selektionsschritt erweitert werden.

5 Zusammenfassung/Abstract

5.1 Zusammenfassung

Die gerichtete Evolution ermöglicht die Modifikation von Proteinen und Nukleinsäuren nach den drei Prinzipien von Darwin - Mutation, Selektion und Replikation. Bisher etablierte Methoden sind im Gegensatz zum natürlichen Evolutionsprozess in ihrer Form diskontinuierlich und in ihrer Variantenanzahl limitiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Verfahren zur kontinuierlichen, zielgerichteten Evolution hochaffiner Protein-Liganden *in vitro* zu etablieren.

Mittels Optimierung einer Vielzahl von Parametern konnte erstmals die Kombination einer fehlerbehafteten DNA-Amplifikationsmethode mit einem *in vitro* Proteinsynthesystem etabliert werden. Dazu wurde die NASBA, ursprünglich eine Methode zur isothermen Amplifikation kurzer RNA-Moleküle, hinsichtlich Reaktionszeit, Pufferbedingungen, Enzymen und Primern auf die Amplifikation von DNA-Templates mit einer Länge bis zu 3,2 kb optimiert. Der Einsatz einer Reversen Transkriptase mit ausreichend intrinsischer RNase H-Aktivität (MMuLV RT) ermöglichte den Verzicht auf exogene RNase H. Durch die Zugabe eines DNA-interkalierenden Farbstoffes konnte die DNA-Amplifikation während der NASBA in Echtzeit visualisiert und optimiert werden.

Das Einbringen von Mutationen während der NASBA basiert auf der fehlerbehafteten Aktivität der T7 RNA Polymerase und der MMuLV RT, die beide keine *proof-reading*-Funktion besitzen. Die Anzahl auftretender Mutationen wurde für verschiedene DNA-Templates verifiziert und konnte durch die Anwendung des seriellen Transfer-Prinzips zusätzlich gesteigert werden.

Für den Selektionsschritt, basierend auf der Affinität zweier Interaktionspartner zueinander, konnten T7 RNA Polymerase-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Expression und Aufreinigung optimiert und die spezifischen Aktivitäten verifiziert werden. Die Fusion der MMuLV RT an verschiedene, zu evolvierende Bindepartner hatte einen vernachlässigbaren Effekt auf die Reverse Transkriptase-Aktivität.

Für die Kombination von NASBA und *in vitro* Proteinexpression wurde das PURE System, das im Gegensatz zu verschiedenen *E. coli* Lysaten keine inhibierende Wirkung auf die DNA-Amplifikation mittels NASBA zeigte, ausgewählt. Das PURE System enthält alle essentiellen Komponenten des *E. coli* Translationsapparates. Die Nukleotid- und Magnesiumionenkonzentrationen stellten sich als äußerst kritisch heraus, konnten aber insofern optimiert werden, als dass erstmals die funktionelle Kombination von NASBA und *in vitro* Proteinsynthese in einem Reaktionsansatz etabliert wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das NASBA-Produkt als Template für die Proteinexpression fungieren kann und die endogen exprimierte MMuLV RT ausreichende Aktivität besitzt, um die NASBA anzutreiben. Erste Versuche mit einem Test-Interaktionspaar (Yes1/PxxP-Motiv des Sam68) zeigten, dass die fehlerbehaftete DNA-Amplifikation und *in vitro* Translation simultan funktionieren, der Selektionsschritt innerhalb des Systems aber weiterer Optimierung bedarf. Damit sind die grundlegenden Voraussetzungen für ein Verfahren zur kontinuierlichen, zielgerichteten Evolution hochaffiner Protein-Liganden geschaffen.

5.2 Abstract

Directed evolution, as an imitation of Darwinian evolution, has become a popular strategy to modify proteins and nucleic acids. Darwinian evolution is based on the three principles of mutation, selection and replication. In contrast to naturally occurring evolution, today's methods for directed evolution are still limited in their variant diversity and discontinuous in their nature.

Therefore, the aim of this work was to establish a system for the continuous, directed evolution of high affinity protein ligands *in vitro*. For this purpose an erroneous DNA amplification method was combined with an *in vitro* protein synthesis system for the first time. NASBA, originally an isothermal method for amplifying short RNA molecules, was optimised regarding incubation temperature, buffer conditions, enzymes and primers to achieve amplification of DNA templates up to 3.2 kb in size. By utilising a reverse transcriptase with sufficient intrinsic RNase H activity, addition of exogenous RNase H became obsolete. The use of DNA intercalating dyes permitted real-time visualisation and optimisation of the DNA amplification process.

Occurring mutations were due to error-prone activities of both involved enzymes - T7 RNA polymerase and MMuLV RT. Mutation rates for several templates were determined and could be increased by applying the serial transfer principle.

Selection relied on the affinity of two interacting partners. By optimising expression and purification parameters of T7 RNA polymerase fusion proteins, their specific activities were determined in real time via *in vitro* transcription assays. The fusion of MMuLV RT to several binding partners, which were supposed to evolve, had only neglectable effects on reverse transcriptase activity.

To combine NASBA and *in vitro* protein expression the PURE System was chosen, which in contrary to several tested *E. coli* lysates, caused no inhibition of DNA amplification during NASBA. The PURE system contains all essential *E. coli* translational components. Since concentrations of nucleotides and magnesium ions turned out to be highly critical, both values had to be readjusted to facilitate a functional combination of NASBA and *in vitro* protein synthesis within one reaction.

Furthermore, it was shown that NASBA products can function as template for protein expression and that endogenously expressed MMuLV RT exhibits enough activity to drive NASBA amplification.

First trials with an interacting couple (Yes1/PxxP motif of Sam68) revealed that both - erroneous DNA amplification and *in vitro* translation - operate simultaneously, but the selection step needs to be further optimised. Taken together, fundamental preconditions to set up a continuous directed evolution system were established within this work.

6 Literaturverzeichnis

- AREZI, B. & HOGREFE, H.H. (2007) Escherichia coli DNA polymerase III epsilon subunit increases Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase fidelity and accuracy of RT-PCR procedures. *Analytical Biochemistry*, 360, 84-91.
- ARGARAÑA, C.E., KUNTZ, I.D., BIRKEN, S., AXEL, R. & CANTOR, C.R. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic Acids Research*, 14, 1871-1882.
- ARNOLD, F.H. (1998) Enzyme engineering reaches the boiling point. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2035-2036.
- ASBACH, B. (2010) Doktorarbeit: Charakterisierung der Interaktion von Sam68 mit SH3-Domänen - Implikationen für die HIV-Replikation. AG Wagner, Universitätsklinikum Regensburg.
- BACK, J.F., OAKENFULL, D. & SMITH, M.B. (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, 18, 5191-5196.
- BAN, N., NISSEN, P., HANSEN, J., MOORE, P.B. & STEITZ, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 289, 905-920.
- BAUER, G.J., MCCASKILL, J.S. & OTTEN, H. (1989) Traveling waves of in vitro evolving RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 7937-7941.
- BELASCO, J.G. & HIGGINS, C.F. (1988) Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene*, 72, 15-23.
- BERGAMINI, G., PREISS, T. & HENTZE, M.W. (2000) Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA (New York, N.Y.)*, 6, 1781-1790.
- BERGER, S.L., WALLACE, D.M., PUSKAS, R.S. & ESCHENFELDT, W.H. (1983) Reverse transcriptase and its associated ribonuclease H: interplay of two enzyme activities controls the yield of single-stranded complementary deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 22, 2365-2372.
- BETTON, J. (2003) Rapid translation system (RTS): a promising alternative for recombinant protein production. *Current Protein & Peptide Science*, 4, 73-80.
- BINZ, H.K., AMSTUTZ, P., KOHL, A., STUMPP, M.T., BRIAND, C., FORRER, P. U. A. (2004) High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nature Biotechnology*, 22, 575-582.
- BIRCH, L., DAWSON, C.E., CORNETT, J.H. & KEER, J.T. (2001) A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 296-301.
- BLAIN, S.W. & GOFF, S.P. (1996) Differential effects of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase mutations on RNase H activity in Mg²⁺ and Mn²⁺. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 1448-1454.
- BODER, E.T., MIDELFORT, K.S. & WITTRUP, K.D. (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10701-10705.
- BODER, E.T. & WITTRUP, K.D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology*, 15, 553-557.

- BORSOOK, H. (1950) Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro. *Physiological Reviews*, 30, 206-219.
- BORST, A., VERHOEF, J., BOEL, E. & FLUIT, A.C. (2002) Clinical evaluation of a NASBA-based assay for detection of *Candida* spp. in blood and blood cultures. *Clinical Laboratory*, 48, 487-492.
- BRACHO, M.A., MOYA, A. & BARRIO, E. (1998) Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *The Journal of General Virology*, 79 (Pt 12), 2921-2928.
- BRADBURY, A. (2001) Selecting by microdialysis. *Nature Biotechnology*, 19, 528-529.
- BRAKMANN, S. & GRZESZIK, S. (2001) An error-prone T7 RNA polymerase mutant generated by directed evolution. *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 2, 212-219.
- BREAKER, R.R. & JOYCE, G.F. (1994) Emergence of a replicating species from an in vitro RNA evolution reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 6093-6097.
- BREMER, H. & DENNIS, P. (1987) Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. (Hrsg F. Neidhardt, J. Ingraham, K. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. Umberger), s. 1527-1542. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- BYRNE, R., LEVIN, J.G., BLADEN, H.A. & NIRENBERG, M.W. (1964) The in vitro formation of a DNA-ribosome complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52, 140-148.
- CADWELL, R.C. & JOYCE, G.F. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods and Applications*, 2, 28-33.
- CHAMES, P., WILLEMSSEN, R.A., ROJAS, G., DIECKMANN, D., REM, L., SCHULER, G. U. A. (2002) TCR-like human antibodies expressed on human CTLs mediate antibody affinity-dependent cytolytic activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169, 1110-1118.
- CHERRY, J.R., LAMSA, M.H., SCHNEIDER, P., VIND, J., SVENDSEN, A., JONES, A. & PEDERSEN, A.H. (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, 17, 379-384.
- COMPTON, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350, 91-92.
- COOK, N. (2003) The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 165-174.
- CRAIG, D., HOWELL, M.T., GIBBS, C.L., HUNT, T. & JACKSON, R.J. (1992) Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Research*, 20, 4987-4995.
- CUNNINGHAM, P.R. & OFENGAND, J. (1990) Use of inorganic pyrophosphatase to improve the yield of in vitro transcription reactions catalyzed by T7 RNA polymerase. *BioTechniques*, 9, 713-714.
- DARKE, B.M., JACKSON, S.K., HANNA, S.M. & FOX, J.D. (1998) Detection of human TNF- α mRNA by NASBA. *Journal of Immunological Methods*, 212, 19-28.
- DARWIN, C. (1859) *On the Origin of Species: By Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London.

- DAVYDOVA, E.K. & ROTHMAN-DENES, L.B. (2003) Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein mediates template recycling during transcription by bacteriophage N4 virion RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9250-9255.
- DEIMAN, B., VAN AARLE, P. & SILLEKENS, P. (2002) Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology*, 20, 163-179.
- DESTEFANO, J.J., MALLABER, L.M., FAY, P.J. & BAMBARA, R.A. (1994) Quantitative analysis of RNA cleavage during RNA-directed DNA synthesis by human immunodeficiency and avian myeloblastosis virus reverse transcriptases. *Nucleic Acids Research*, 22, 3793-3800.
- DOAK, S.H., JENKINS, G.J.S., JOHNSON, G.E., QUICK, E., PARRY, E.M. & PARRY, J.M. (2007) Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Research*, 67, 3904-3911.
- DOI, N. & YANAGAWA, H. (1999) STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro. *FEBS Letters*, 457, 227-230.
- DRUMMOND, D.A., IVERSON, B.L., GEORGIU, G. & ARNOLD, F.H. (2005) Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *Journal of Molecular Biology*, 350, 806-816.
- DUNN, J.J. & STUDIER, F.W. (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *Journal of Molecular Biology*, 166, 477-535.
- FARMERIE, W.G., LOEB, D.D., CASAVANT, N.C., HUTCHISON, C.A., EDGELL, M.H. & SWANSTROM, R. (1987) Expression and processing of the AIDS virus reverse transcriptase in Escherichia coli. *Science (New York, N.Y.)*, 236, 305-308.
- FRENCH, C.T., ROSS, C.D., KEYSAR, S.B., JOSHI, D.D., LIM, C. & FOX, M.H. (2006) Comparison of the mutagenic potential of 17 physical and chemical agents analyzed by the flow cytometry mutation assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 602, 14-25.
- FUCHS, B., ZHANG, K., ROCK, M.G., BOLANDER, M.E. & SARKAR, G. (1999) High temperature cDNA synthesis by AMV reverse transcriptase improves the specificity of PCR. *Molecular Biotechnology*, 12, 237-240.
- GALE, E.F. & FOLKES, J.P. (1954) Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino-acid incorporation in disrupted staphylococcal cells. *Nature*, 173, 1223-1227.
- GEBINOVA, M. & OEHLENSCHLÄGER, F. (1996) Comparison of self-sustained sequence-replication reaction systems. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 235, 256-261.
- GEORGIU, G., STATHOPOULOS, C., DAUGHERTY, P.S., NAYAK, A.R., IVERSON, B.L. & CURTISS, R. (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnology*, 15, 29-34.
- GERARD, G.F., D'ALESSIO, J.M. & KOTEWICZ, M.L. (1989) cDNA synthesis by cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking RNase H activity. *Focus*, 11, 66-69.
- GERARD, G.F., FOX, D.K., NATHAN, M. & D'ALESSIO, J.M. (1997) Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Molecular Biotechnology*, 8, 61-77.
- GERARD, G.F., POTTER, R.J., SMITH, M.D., ROSENTHAL, K., DHARIWAL, G., LEE, J. & CHATTERJEE, D.K. (2002) The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. *Nucleic Acids Research*, 30, 3118-3129.

- GILBERT, W. (1986) Origin of life: The RNA world. *Nature*, 319, 618-618.
- GILBOA, E., MITRA, S.W., GOFF, S. & BALTIMORE, D. (1979) A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell*, 18, 93-100.
- GINGERAS, T.R., WHITFIELD, K.M. & KWOH, D.Y. (1990) Unique features of the self-sustained sequence replication (3SR) reaction in the in vitro amplification of nucleic acids. *Annales De Biologie Clinique*, 48, 498-501.
- GLAZER, A.N. & RYE, H.S. (1992) Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection. *Nature*, 359, 859-861.
- GRANDGENETT, D., QUINN, T., HIPPENMEYER, P.J. & OROSZLAN, S. (1985) Structural characterization of the avian retrovirus reverse transcriptase and endonuclease domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 8243-8249.
- GRANDGENETT, D.P., GERARD, G.F. & GREEN, M. (1973) A single subunit from avian myeloblastosis virus with both RNA-directed DNA polymerase and ribonuclease H activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 230-234.
- GREENE, S.R., MOE, C.L., JAYKUS, L.A., CRONIN, M., GROSSO, L. & AARLE, P.V. (2003) Evaluation of the NucliSens Basic Kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens. *Journal of Virological Methods*, 108, 123-131.
- GRUNBERG-MANAGO, M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annual Review of Genetics*, 33, 193-227.
- GUATELLI, J.C., WHITFIELD, K.M., KWOH, D.Y., BARRINGER, K.J., RICHMAN, D.D. & GINGERAS, T.R. (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1874-1878.
- GUBLER, U., BERGER, S.L. & KIMMEL, A. (1987) . In *Methods in Enzymology: Vol. 152* s. 330-335. Academic Press, San Diego.
- GUBLER, U. & HOFFMAN, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25, 263-269.
- GUERRIER-TAKADA, C., GARDINER, K., MARSH, T., PACE, N. & ALTMAN, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35, 849-857.
- GUICHÓN, A., CHIPARELLI, H., MARTÍNEZ, A., RODRÍGUEZ, C., TRENTO, A., RUSSI, J.C. & CARBALLAL, G. (2004) Evaluation of a new NASBA assay for the qualitative detection of hepatitis C virus based on the NucliSens Basic Kit reagents. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 29, 84-91.
- HANES, J., JERMUTUS, L., WEBER-BORNHAUSER, S., BOSSHARD, H.R. & PLÜCKTHUN, A. (1998) Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14130-14135.
- HANES, J., SCHAFFITZEL, C., KNAPPIK, A. & PLÜCKTHUN, A. (2000) Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature Biotechnology*, 18, 1287-1292.
- HARUNA, I. & SPIEGELMAN, S. (1965) Autocatalytic synthesis of a viral RNA in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 150, 884-886.
- HARVARD UNIVERSITY, G. (2009) Toward Synthetic Life: Scientists Create Ribosomes -- Cell Protein Machinery. *Science Daily*, Retrieved from <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/03/090309104434.htm>.

- HEIM, A. & SCHUMANN, J. (2002) Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples. *Journal of Virological Methods*, 103, 101-107.
- HENKE, W., HERDEL, K., JUNG, K., SCHNORR, D. & LOENING, S.A. (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 25, 3957-3958.
- HIDA, K., HANES, J. & OSTERMEIER, M. (2007) Directed evolution for drug and nucleic acid delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1562-1578.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S. & GRIFFITH, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 10, 413-417.
- HINO, M., KATAOKA, M., KAJIMOTO, K., YAMAMOTO, T., KIDO, J., SHINOHARA, Y. & BABA, Y. (2008) Efficiency of cell-free protein synthesis based on a crude cell extract from *Escherichia coli*, wheat germ, and rabbit reticulocytes. *Journal of Biotechnology*, 133, 183-189.
- HOUTS, G.E., MIYAGI, M., ELLIS, C., BEARD, D. & BEARD, J.W. (1979) Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *Journal of Virology*, 29, 517-522.
- HUST, M. & DÜBEL, S. (2004) Mating antibody phage display with proteomics. *Trends in Biotechnology*, 22, 8-14.
- IOST, I. & DREYFUS, M. (1995) The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *The EMBO Journal*, 14, 3252-3261.
- IOST, I., GUILLEREZ, J. & DREYFUS, M. (1992) Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo. *Journal of Bacteriology*, 174, 619-622.
- JACKSON, R.J. & HUNT, T. (1983) Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods in Enzymology*, 96, 50-74.
- JEAN, J., BLAIS, B., DARVEAU, A. & FLISS, I. (2001) Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5593-5600.
- JOHANNES, G., CARTER, M.S., EISEN, M.B., BROWN, P.O. & SARNOW, P. (1999) Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13118-13123.
- JOYCE, G.F. (2007) Forty years of in vitro evolution. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 46, 6420-6436.
- KANAYA, E., SAKABE, T., NGUYEN, N.T., KOIKEDA, S., KOGA, Y., TAKANO, K. & KANAYA, S. (2010) Cloning of the RNase H genes from a metagenomic DNA library: identification of a new type 1 RNase H without a typical active-site motif. *Journal of Applied Microbiology*.
- KEEFE, A.D. & SZOSTAK, J.W. (2001) Functional proteins from a random-sequence library. *Nature*, 410, 715-718.
- KELLNER, M. (2007) Diplomarbeit: Generierung von SH3-Domänen mit verbesserter Affinität zu Sam68 mittels Phagen-Display-Technologie. AG Wagner, Universitätsklinikum Regensburg.
- KIEVITS, T., VAN GEMEN, B., VAN STRIJP, D., SCHUKKINK, R., DIRCKS, M., ADRIAANSE, H. U. A. (1991) NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *Journal of Virological Methods*, 35, 273-286.

- KIM, D.M., KIGAWA, T., CHOI, C.Y. & YOKOYAMA, S. (1996) A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 239, 881-886.
- KLASENS, B.I., HUTHOFF, H.T., DAS, A.T., JEENINGA, R.E. & BERKHOUT, B. (1999) The effect of template RNA structure on elongation by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1444, 355-370.
- KÖHRER, C., MAYER, C., GRÖBNER, P. & PIENDL, W. (1996) Use of T7 RNA polymerase in an optimized *Escherichia coli* coupled in vitro transcription-translation system. Application in regulatory studies and expression of long transcription units. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 236, 234-239.
- KOPSIDAS, G., CARMAN, R.K., STUTT, E.L., RAICEVIC, A., ROBERTS, A.S., SIOMOS, M.V. U. A. (2007) RNA mutagenesis yields highly diverse mRNA libraries for in vitro protein evolution. *BMC Biotechnology*, 7, 18.
- KOTEWICZ, M.L., SAMPSON, C.M., D'ALESSIO, J.M. & GERARD, G.F. (1988) Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Research*, 16, 265-277.
- KRUGER, K., GRABOWSKI, P.J., ZAUG, A.J., SANDS, J., GOTTSCHLING, D.E. & CECHE, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31, 147-157.
- KRUPP, G. (1989) Unusual promoter-independent transcription reactions with bacteriophage RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 17, 3023-3036.
- KUBO, Y., TAKEUCHI, K., BOONMAR, S., KATAYAMA, T., CHOO, Q.L., KUO, G. U. A. (1989) A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucleic Acids Research*, 17, 10367-10372.
- KUDLICKI, W., KRAMER, G. & HARDESTY, B. (1992) High efficiency cell-free synthesis of proteins: refinement of the coupled transcription/translation system. *Analytical Biochemistry*, 206, 389-393.
- KUNG, H.F., REDFIELD, B., TREADWELL, B.V., ESKIN, B., SPEARS, C. & WEISSBACH, H. (1977) DNA-directed in vitro synthesis of beta-galactosidase. Studies with purified factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 6889-6894.
- KWOH, D.Y., DAVIS, G.R., WHITFIELD, K.M., CHAPPELLE, H.L., DIMICHELE, L.J. & GINGERAS, T.R. (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 1173-1177.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LAMBERT, A.J., NASCI, R.S., CROPP, B.C., MARTIN, D.A., ROSE, B.C., RUSSELL, B.J. & LANCIOTTI, R.S. (2005) Nucleic acid amplification assays for detection of La Crosse virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1885-1889.
- LEEMHUIS, H., STEIN, V., GRIFFITHS, A.D. & HOLLFELDER, F. (2005) New genotype-phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 472-478.
- LEUNG, D., CHEN, E. & GOEDEL, D. (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction., 1, 11-15.
- LEVIN, B.R., PERROT, V. & WALKER, N. (2000) Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, 154, 985-997.

- LEVY, M. & ELLINGTON, A.D. (2008) Directed evolution of streptavidin variants using in vitro compartmentalization. *Chemistry & Biology*, 15, 979-989.
- LI, S.S. (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *The Biochemical Journal*, 390, 641-653.
- LICHTY, J.J., MALECKI, J.L., AGNEW, H.D., MICHELSON-HOROWITZ, D.J. & TAN, S. (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification*, 41, 98-105.
- LOPEZ, P.J., MARCHAND, I., JOYCE, S.A. & DREYFUS, M. (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Molecular Microbiology*, 33, 188-199.
- MA, W.P. & CROUCH, R.J. (1996) Escherichia coli RNase HI inhibits murine leukaemia virus reverse transcription in vitro and yeast retrotransposon Ty1 transposition in vivo. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 1, 581-593.
- MALBOEUF, C.M., ISAACS, S.J., TRAN, N.H. & KIM, B. (2001) Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis. *BioTechniques*, 30, 1074-1078, 1080, 1082, passim.
- MALINA, A., KHAN, S., CARLSON, C.B., SVITKIN, Y., HARVEY, I., SONENBERG, N. U. A. (2005) Inhibitory properties of nucleic acid-binding ligands on protein synthesis. *FEBS Letters*, 579, 79-89.
- MATSUURA, T. & YOMO, T. (2006) In vitro evolution of proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 449-456.
- MATTHEAKIS, L.C., BHATT, R.R. & DOWER, W.J. (1994) An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9022-9026.
- MAYER, B.J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of Cell Science*, 114, 1253-1263.
- MENDEL, D., ELLMAN, J.A., CHANG, Z., VEENSTRA, D.L., KOLLMAN, P.A. & SCHULTZ, P.G. (1992) Probing protein stability with unnatural amino acids. *Science (New York, N.Y.)*, 256, 1798-1802.
- MILLER, S.L. & UREY, H.C. (1959) Organic compound synthesis on the primitive earth. *Science (New York, N.Y.)*, 130, 245-251.
- MILLIGAN, J.F., GROEBE, D.R., WITHERELL, G.W. & UHLENBECK, O.C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Research*, 15, 8783-8798.
- MILLS, D.R., PETERSON, R.L. & SPIEGELMAN, S. (1967) An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58, 217-224.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263-273.
- MUNISHKIN, A.V., VORONIN, L.A., UGAROV, V.I., BONDAREVA, L.A., CHETVERINA, H.V. & CHETVERIN, A.B. (1991) Efficient templates for Q beta replicase are formed by recombination from heterologous sequences. *Journal of Molecular Biology*, 221, 463-472.

- NAKAHARA, K., HATAYA, T. & UYEDA, I. (1998) Inosine 5'-triphosphate can dramatically increase the yield of NASBA products targeting GC-rich and intramolecular base-paired viroid RNA. *Nucleic Acids Research*, 26, 1854-1856.
- NIRENBERG, M.W. & MATTHAEI, J.H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 1588-1602.
- ODEGRIP, R., COOMBER, D., ELDRIDGE, B., HEDERER, R., KUHLMAN, P.A., ULLMAN, C. U. A. (2004) CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2806-2810.
- ODEGRIP, R., NILSSON, A.S. & HAGGÅRD-LJUNGQUIST, E. (2006) Identification of a gene encoding a functional reverse transcriptase within a highly variable locus in the P2-like coliphages. *Journal of Bacteriology*, 188, 1643-1647.
- OEHLENSCHLÄGER, F. & EIGEN, M. (1997) 30 years later--a new approach to Sol Spiegelman's and Leslie Orgel's in vitro evolutionary studies. Dedicated to Leslie Orgel on the occasion of his 70th birthday. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere: The Journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*, 27, 437-457.
- OLIPHANT, A.R., NUSSBAUM, A.L. & STRUHL, K. (1986) Cloning of random-sequence oligodeoxynucleotides. *Gene*, 44, 177-183.
- PATRICK, W.M., FIRTH, A.E. & BLACKBURN, J.M. (2003) User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Engineering*, 16, 451-457.
- PELHAM, H.R. & JACKSON, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 67, 247-256.
- POLLARD, K.M., CHAN, E.K., GRANT, B.J., SULLIVAN, K.F., TAN, E.M. & GLASS, C.A. (1990) In vitro posttranslational modification of lamin B cloned from a human T-cell line. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 2164-2175.
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I. & BELFRAGE, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598-599.
- DEL PRETE, M.J., VERNAL, R., DOLZNIG, H., MÜLLNER, E.W. & GARCIA-SANZ, J.A. (2007) Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA (New York, N.Y.)*, 13, 414-421.
- RAJENDRAKUMAR, C.S., SURYANARAYANA, T. & REDDY, A.R. (1997) DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Letters*, 410, 201-205.
- REETZ, M.T., BOCOLA, M., CARBALLEIRA, J.D., ZHA, D. & VOGEL, A. (2005) Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 44, 4192-4196.
- REETZ, M.T. & SANCHIS, J. (2008) Constructing and analyzing the fitness landscape of an experimental evolutionary process. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 9, 2260-2267.
- REETZ, M.T., WANG, L. & BOCOLA, M. (2006) Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45, 1236-1241.
- RESTO, E., IIDA, A., VAN CLEVE, M.D. & HECHT, S.M. (1992) Amplification of protein expression in a cell free system. *Nucleic Acids Research*, 20, 5979-5983.

- RICCHETTI, M. & BUC, H. (1990) Reverse transcriptases and genomic variability: the accuracy of DNA replication is enzyme specific and sequence dependent. *The EMBO Journal*, 9, 1583-1593.
- RICHARDSON, J.P. (1991) Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell*, 64, 1047-1049.
- ROBERTS, B.E. & PATERSON, B.M. (1973) Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 2330-2334.
- ROBERTS, J.D., BEBENEK, K. & KUNKEL, T.A. (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science (New York, N.Y.)*, 242, 1171-1173.
- ROBERTS, R.W. & SZOSTAK, J.W. (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 12297-12302.
- ROMANO, J.W., WILLIAMS, K.G., SHURTLIFF, R.N., GINOCCHIO, C. & KAPLAN, M. (1997) NASBA technology: isothermal RNA amplification in qualitative and quantitative diagnostics. *Immunological Investigations*, 26, 15-28.
- ROTH, M.J., TANESE, N. & GOFF, S.P. (1985) Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 9326-9335.
- SABORIO, J.L. & KOCH, G. (1973) Reversible inhibition of protein synthesis in HeLa cells by dimethylsulfoxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 8343-8347.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230, 1350-1354.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. (2001) Molecular cloning. CSHL Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.
- SANO, T., PANDORI, M.W., CHEN, X., SMITH, C.L. & CANTOR, C.R. (1995) Recombinant core streptavidins. A minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 28204-28209.
- SAWATA, S.Y. & TAIRA, K. (2003) Modified peptide selection in vitro by introduction of a protein-RNA interaction. *Protein Engineering*, 16, 1115-1124.
- SAYLOR, P., WANG, C., HIRAI, T.J. & ADAMS, J.A. (1998) A second magnesium ion is critical for ATP binding in the kinase domain of the oncoprotein v-Fps. *Biochemistry*, 37, 12624-12630.
- SCATCHARD, G. (1948) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51, 660-672.
- SCHENBORN, E.T. & MIERENDORF, R.C. (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Research*, 13, 6223-6236.
- SCHMIDT, T.G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *Journal of Molecular Biology*, 255, 753-766.

- SCHMIDT, T.G. & SKERRA, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Engineering*, 6, 109-122.
- SHEN, X., VALENCIA, C.A., SZOSTAK, J.W., SZOSTAK, J., DONG, B. & LIU, R. (2005) Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 5969-5974.
- SHIMIZU, Y., INOUE, A., TOMARI, Y., SUZUKI, T., YOKOGAWA, T., NISHIKAWA, K. & UEDA, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature Biotechnology*, 19, 751-755.
- SHIMIZU, Y., KANAMORI, T. & UEDA, T. (2005) Protein synthesis by pure translation systems. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36, 299-304.
- SINGER, V.L., LAWLOR, T.E. & YUE, S. (1999) Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutation Research*, 439, 37-47.
- SMITH, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228, 1315-1317.
- SOOKNANAN, R., VAN GEMEN, B. & MALEK, L. (1995) Nucleic acid sequence-based amplification. In *Molecular Methods for Virus Detection* (Hrsg D. Wiedbrauk & D. Farkas), s. 261-285, 1. edition. Academic Press, San Diego.
- SPARKS, A.B., RIDER, J.E., HOFFMAN, N.G., FOWLKES, D.M., QUILLAM, L.A. & KAY, B.K. (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 1540-1544.
- SPEEDING, G. (1990) Isolation and analysis of ribosomes from prokaryotes, eukaryotes, and organelles. In *Ribosomes and protein synthesis: a practical approach* (Hrsg G. Spedding), s. 1-29. IRL Press at Oxford University Press, New York, NY.
- SPIEGELMAN, S., HARUNA, I., HOLLAND, I.B., BEAUDREAU, G. & MILLS, D. (1965) The synthesis of a self-propagating and infectious nucleic acid with a purified enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54, 919-927.
- SPIESS, A. & IVELL, R. (2002) A highly efficient method for long-chain cDNA synthesis using trehalose and betaine. *Analytical Biochemistry*, 301, 168-174.
- SPIRIN, A.S., BARANOV, V.I., RYABOVA, L.A., OVODOV, S.Y. & ALAKHOV, Y.B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science (New York, N.Y.)*, 242, 1162-1164.
- STEMMER, W.P. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370, 389-391.
- STREISINGER, G., OKADA, Y., EMRICH, J., NEWTON, J., TSUGITA, A., TERZAGHI, E. & INOUE, M. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 31, 77-84.
- STUKE, A.W., AHMAD-OMAR, O., HOEFER, K., HUNSMANN, G. & JENTSCH, K.D. (1997) Mutations in the SIV env and the M13 lacZa gene generated in vitro by reverse transcriptases and DNA polymerases. *Archives of Virology*, 142, 1139-1154.
- SUGIYAMA, M., ITO, N. & MINAMOTO, N. (2003) Isothermal amplification of rabies virus gene. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 65, 1063-1068.

- SUN, Y., HEGAMYER, G. & COLBURN, N.H. (1993) PCR-direct sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to mouse c-jun. *BioTechniques*, 15, 372-374.
- SUZUKI, M., CHRISTIANS, F.C., KIM, B., SKANDALIS, A., BLACK, M.E. & LOEB, L.A. (1996) Tolerance of different proteins for amino acid diversity. *Molecular Diversity*, 2, 111-118.
- SWITZER, W.M. & HENEINE, W. (1995) Rapid screening of open reading frames by protein synthesis with an in vitro transcription and translation assay. *BioTechniques*, 18, 244-248.
- TANESE, N. & GOFF, S.P. (1988) Domain structure of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNase H activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 1777-1781.
- TAWFIK, D.S. & GRIFFITHS, A.D. (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*, 16, 652-656.
- TEMIN, H.M. & MIZUTANI, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-1213.
- TSE, T.P. & TAYLOR, J.M. (1977) Translation of albumin messenger RNA in a cell-free protein-synthesizing system derived from wheat germ. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 1272-1278.
- TURNER, N.J. (2003) Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 21, 474-478.
- UYTTENDAELE, M., SCHUKKINK, R., VAN GEMEN, B. & DEBEVERE, J. (1995) Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a modified FDA method. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 77-89.
- VARADARAJ, K. & SKINNER, D.M. (1994) Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*, 140, 1-5.
- VARELA-ECHAVARRÍA, A., GARVEY, N., PRESTON, B.D. & DOUGHERTY, J.P. (1992) Comparison of Moloney murine leukemia virus mutation rate with the fidelity of its reverse transcriptase in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 24681-24688.
- VILLALVA, C., TOURIOL, C., SEURAT, P., TREMPAT, P., DELSOL, G. & BROUSSET, P. (2001) Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMART PCR cDNA synthesis system. *BioTechniques*, 31, 81-83, 86.
- VOGES, D., WATZELE, M., NEMETZ, C., WIZEMANN, S. & BUCHBERGER, B. (2004) Analyzing and enhancing mRNA translational efficiency in an *Escherichia coli* in vitro expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318, 601-614.
- VOISSET, C., MANDRAND, B. & PARANHOS-BACCALÀ, G. (2000) RNA amplification technique, NASBA, also amplifies homologous plasmid DNA in non-denaturing conditions. *BioTechniques*, 29, 236-238, 240.
- VOSS, S. & SKERRA, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Engineering*, 10, 975-982.
- WAHL, L.M., GERRISH, P.J. & SAIKA-VOIVOD, I. (2002) Evaluating the impact of population bottlenecks in experimental evolution. *Genetics*, 162, 961-971.
- WALTER, N.G. & STRUNK, G. (1994) Strand displacement amplification as an in vitro model for rolling-circle replication: deletion formation and evolution during serial transfer.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 7937-7941.
- WAN, L., TWITCHETT, M.B., ELTIS, L.D., MAUK, A.G. & SMITH, M. (1998) In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12825-12831.
- WEBER, J. & GROSSE, F. (1989) Fidelity of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase in copying natural DNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 1379-1393.
- WELLS, J.A., VASSER, M. & POWERS, D.B. (1985) Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*, 34, 315-323.
- WILSON, D.S., KEEFE, A.D. & SZOSTAK, J.W. (2001) The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3750-3755.
- WINNICK, T. (1950) Studies on the mechanism of protein synthesis in embryonic and tumor tissues. II. Inactivation of fetal rat liver homogenates by dialysis, and reactivation by the adenylic acid system. *Archives of Biochemistry*, 28, 338-347.
- WOLFE, S.M. & WEISBERGER, A.S. (1965) Protein synthesis by reticulocyte ribosomes, II. The effects of magnesium ion and chloramphenicol on induced protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53, 991-998.
- WOOD, W.B. & BERG, P. (1962) The effect of enzymatically synthesized ribonucleic acid on amino acid incorporation by a soluble protein-ribosome system from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48, 94-104.
- WRIGHT, M.C. & JOYCE, G.F. (1997) Continuous in vitro evolution of catalytic function. *Science (New York, N.Y.)*, 276, 614-617.
- WRIGHT, S. (1932) The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proceedings of the Sixth International Congress on Genetics*, 355-366.
- YING, B., TAGUCHI, H., UEDA, H. & UEDA, T. (2004) Chaperone-assisted folding of a single-chain antibody in a reconstituted translation system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 1359-1364.
- YONEZAWA, M., DOI, N., HIGASHINAKAGAWA, T. & YANAGAWA, H. (2004) DNA display of biologically active proteins for in vitro protein selection. *Journal of Biochemistry*, 135, 285-288.
- YONEZAWA, M., DOI, N., KAWAHASHI, Y., HIGASHINAKAGAWA, T. & YANAGAWA, H. (2003) DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries. *Nucleic Acids Research*, 31, e118.
- YOU, L. & ARNOLD, F.H. (1996) Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Engineering*, 9, 77-83.
- ZAIA, J.A. & ROSSI, J.J. (1989) Confirmation of HIV infection using gene amplification. *Transfusion Medicine Reviews*, 3, 27-30.
- ZUBAY, G. (1973) In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annual Review of Genetics*, 7, 267-287.

7 Anhang

7.1 Vektorkarten

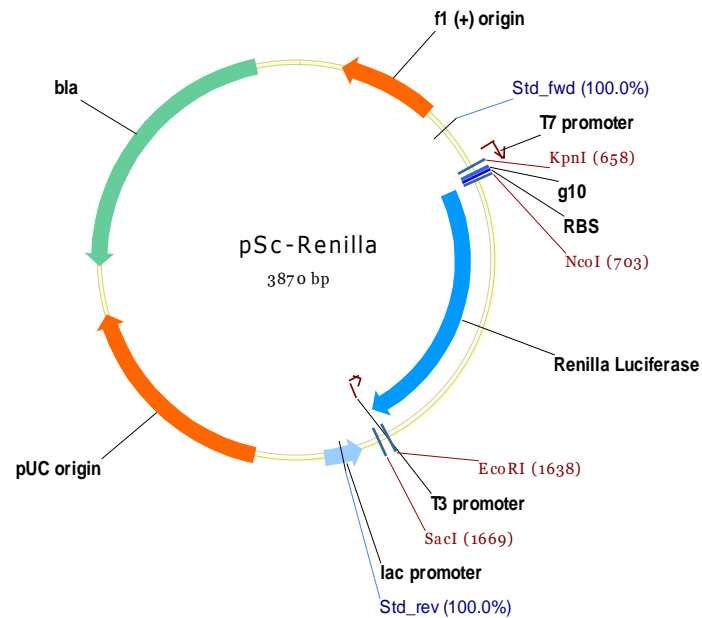


Abb. 49: Vektorkarte pSc-Renilla

Der Vektor enthält folgende Merkmale: die T7 Promotor-Sequenz, einen Translations *Enhancer*-Bereich (g10), eine Ribosomenbindestelle (RBS), das Gen für die Renilla Luciferase, die T3 Promotor-Sequenz, die lac Promotor-Sequenz, den Replikationsursprung für *E. coli* (pUC origin), das β -Laktamase-Gen (bla), den Replikationsursprung für den Bakteriophagen f1 (f1 (+) origin)

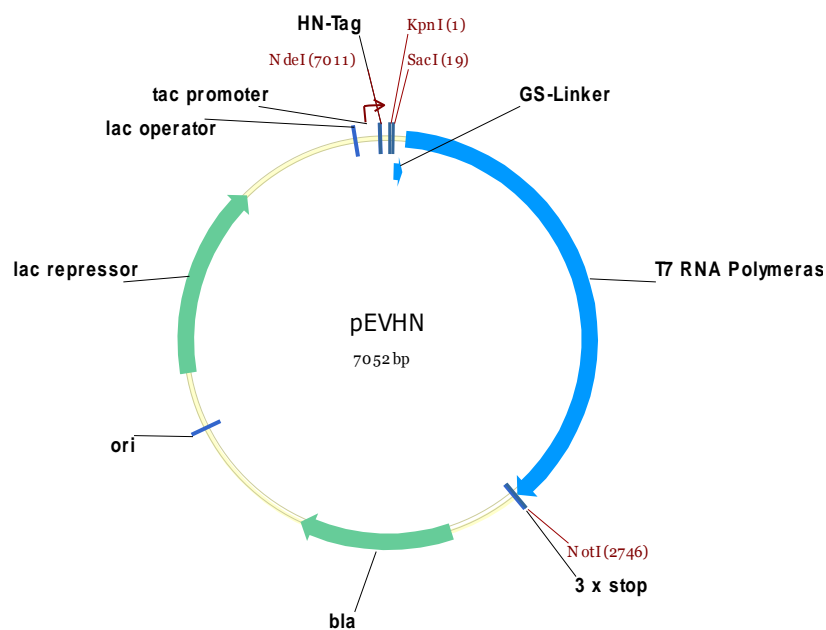


Abb. 50: Vektorkarte pEVHN

Der Expressionsvektor enthält folgende Merkmale: die cDNA für einen HN-Tag, die cDNA für einen Glycin-Serin-Linker (GS-Linker), die kodierende Sequenz für die T7 RNA Polymerase, das β -Laktamase-Gen (bla), einen Replikationsursprung für *E. coli* (ori), das Lac Repressor-Gen, einen Lac Operator-Bereich und die Tac Promotor-Sequenz

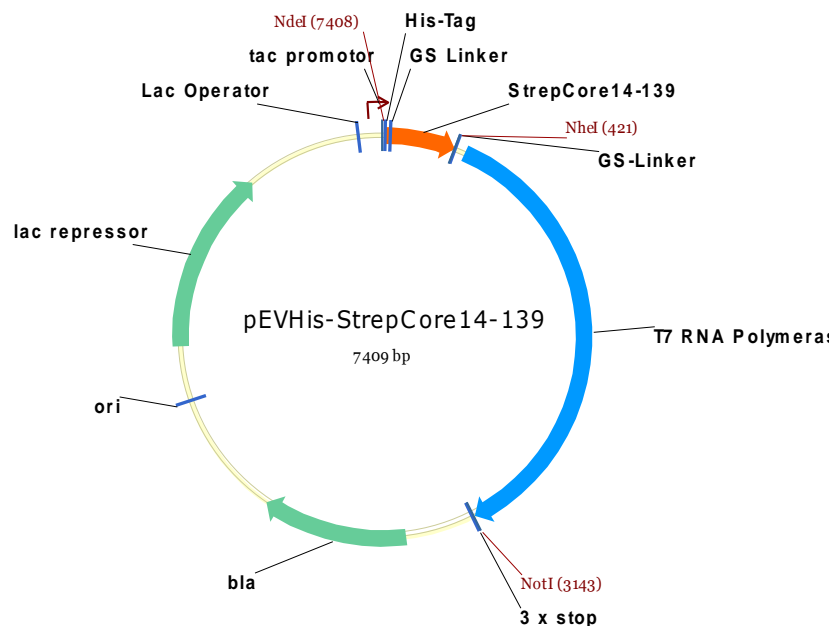


Abb. 51: Vektorkarte pEVHis-StrepCore13-139

Der Expressionsvektor enthält folgende Merkmale: die cDNA für einen His-Tag, die cDNA für einen Glycin-Serin-Linker (GS-Linker), die kodierende Sequenz für eine verkürzte Streptavidin-Variante (StrepCore13-139) in Fusion mit der T7 RNA Polymerase, das β -Laktamase-Gen (bla), einen Replikationsursprung für *E. coli* (ori), das Lac Repressor-Gen, einen Lac Operator-Bereich und die Tac Promotor-Sequenz

7.2 Optimierte Gensequenzen

Bei der Optimierung von Gensequenzen wird, abhängig vom jeweiligen Organismus, auf die Verwendung häufiger Codons (*codon adaptation index*, CAI) geachtet, um eine hohe Expression des gewünschten Proteins zu erreichen. Außerdem werden Regionen mit besonders hohen (> 80%) oder niedrigen (< 30%) GC-Gehalten möglichst vermieden. Alle Gensequenzen wurden bei der GENEART AG auf die Expression in *E. coli* optimiert und synthetisiert.

MMuLV RT_GC (CAI: 0,97; GC-Gehalt: 57,5%) plus **FLAG-Tag**

atggactacaaggacgacgatgacaagggtcagccgctgcaggtgctgacacctgaacattgaagatgaacatcgctctgcatgaaacagcaaagaaccggatgtgagcctgggcagcacctggctgtctgatttccgcaggcgtggcggaaccggcggtatgggccttgctgttcgtagcggcgccgctgattattccgctgaaagcgaccagcaccccggtgagcattaaacagtatccgatgagccaggaagcgctctgggcattaaaccgcatattcagcgtctgctggatcagggcattctggtgccgtgtagagcccggtgaacaccccgctgctgcggtgaaaaaacgggacccaacgattatctccggtgcaggtatctgcgtgaagtgaacaaacgtgtggaagatattcatccgaccgtgccgaatccgtataacctgctgtgctggcctgccgagccatcagtggtataacctgctggatctgaaagatgcgtttttgcctgctgtcatccgaccagccagccgctgtttgcgtttgaatggcgtgatccggaatggcattagcgccagctgacctggaccgctgctgcagggcttaaaaacagcccgaccctgtttgatgaagcgtgcatcgtgatctggccgatttctgattcagcatccggatctgattctgtcagtagtggtgatctgctgctggtgcccgcagcagcagctggattgccagcagggcacccgtgcaactgctcagaccctgggcaacctgggctatcgtgcgagcgcgaaaaaacgcgagatttgccagaaacaggtgaaatatctgggctatctgctgaaagaaggccagcgttggtgtagcgaagcgctgaaagaaaccggtatggggcagccgaccgcgaaaccccgctgagctgcgtgaatttctggcaccgcccgtttgcccgtctgtgattccgggctttgcggaatggcgccagccgctgatccgctgacaaaaccgtgacgtgttttactgggggtccggatcagcagaaagcgtatcaggaaattaaacaggcgctgctgaccgcaccggcgctgggtctgccgatctgaccaaaccgtttgagctgttctggtggaataaacagggtatgcgaaaggcgtgctgaccagaaactgggcccgtggcgctgctccggttgctgatctgagcaaaaaactggaccgggtgcggcggttgcccgctgctgcgcatggttgcggcattgagggtgctgaccaagatgcgggcaaaactgacgatgggccaaccgctggtgattctggccccgatgcggtggaagcgtggtgaaacagcccgccgatcgttggtgcttctaacgcgcgtatgaccattatcaggccctgctgctggataccgatcgtgtgcagtttgcccgggtggtggcgctgaatccggcgaccctgctgccgctgccggaagaaggcctgcagcataactgcctggatattctggccgaagcgtatggcaccgctccgatctgacggatcaaccgctgccggtatgcggatcatactggtataccgatggcagcagcctgctgcaggaaggtcagcgtaaagcgggtgcggcggtgaccaccgaaaccgaagtatttggcgaaagcgtgcccggcaggcacctctgcacagcgtgcggagctgattgcgctgaccagggcgtgaaaatggcggaaggcaaaaaactgaacgtgtataccgatagccgttatgcgtttgcgaccgcgcatatt

catggcgaaatttatcgctgctgctggcctgctgaccagcgaaggcgaagaaatcaaaaacaaagatgaaattctggccctgctgaa
agcgtgtttctgccgaaacgtctgagcattattcattgcccgggtcatcagaaaggccatagcgcggaagcgcgtggcaaccgtatg
gcggatcaggcggcacgtaaagcggcgattaccgaaacctaa

MMuLV RT (CAI: 0,8; GC-Gehalt: 46%) plus **FLAG-Tag**

atggactacaaggacgacgatgacaagcgctctattctggaattcgaaggcggcggtagcgaagggtggcagcgaaggcggg
ggttctgaagggtggcgtagcatgggtcaaccactgcaagttctgactctgaacattgaagatgaacatcgctgcatgaaacttctaa
agaaccggatgtttctctgggttctacttggctgtctgatttccacaagcatgggcagaaactgggtgatgggtctggctgttctgcaag
caccactgatttccactgaaagcaacttctactccgggttagcattaaacaatatccgatgtctcaagaagcacgctgtgggtattaaac
cacatattcagcgtctgctggatcaaggatattctggttccatgtcagagtccttgaatactccactgctgccagttaaaaaacaggca
ccaatgattatcgctccagttcaagatctcggtgaagtgaataaacgtgtggaagatattcatccaactgtccgaatccatataatctgct
gtctggctgccaccatctcatcaatgggtatactgtgctggaatcgaagatgcatTTTTTgtctgctgcatcaacttctcaaccactgt
ttgcatTTTgaatggcgtagccagaaatgggtatttctggtcaactgactggtgactgctgccacaaggTTTTTaaaaatagcccaccct
gTTTgatgaagcactgcatcgtgatctggctgatttctgattcaacatccggatctgattctgctgcaatatgTTTgatgactgctgctggctg
caacttctgagctggattgtcagcaaggctactgctgactgctgagactctgggaatctgggttatctgctgctgcaaaaaagcac
agatttccagaaacaggttaaatactgggtatctgctgaaagaaggtaacgttggctgactgaagcacgtaaagaaactgtaac
gggtcagcctaccccaaaaactccacgtcaactcgctgaatttctgggtactgcaaggTTTTTgtctgctggttccaggTTTTTgcagaaa
tggcagcaccactgtaccactgactaaaactgggtactctgTTTaatgggggtccggatcaacaaaaagcgtatcaggaaattaaaca
ggcactgtgactgaccagcactgggtctgccagatctgactaaaccatttgactgTTTgtggtgaaaaacagggttatgcaaaa
gggttctgactcaaaaaactgggtccttggcgtgctccagttgcatactgagcaaaaaactggaccagttgcagcagggtggccacc
atgtctgcgcatggttgcagcaattgcagttctgactaaagatgcaggtaaactgactatgggacaacctctggttattctggtccacat
gcagttgaagcactggttaaacaaccaccagatcgttggctgctaatgcacgtatgactcattatcaagcactgctgctggaactgat
cgtgttcaatttgggtccagttgtgactgaatccagcaactctgctgccactgccagaagaaggctgcaacataattgtctggaattct
ggccgaagcacatggtactcgtctgatctgactgatcaaccgctgccagatgcagatcatacttggtataccgatggttctctctgctg
caggaaggacaacgtaaaagcagggtgcagcagttactactgaaaccgaagttatttggcaaaaagcactgccagcagggtactagt
cacaacgtgcagagctgattgactgactcaagcactgaaaatggcggaaggcaaaaaactgaatgtgtataccgatagccgttat
gcatttgaactgcgcatattcatggcgaaatttatcgctgctgctggtctgctgacttctgaaggcaagaaattaaaaacaagatgaa
attctggtctgctgaaagcactgtttctgcaaaacgtctgagcattattcatttccgggtcatcaaaaaggctcattctgctgaagcacg
tgtaatcgtatggcagatcaagcagcacgtaaagcagcaattaccgaaacctaa

StrepCore13-139 plus **His Tag**

catatgcatcatcatcaccatcatcaccatcatcaggcagcgaagcgggtattaccggcacctggtataaccagctgggcagcacc
tttatttgaccgcgggtgcggatggtgcgtgaccggcacctatgaaagcgcggtgggcaacgcggaaagccgttatgtgctgacc
ggccgttatgatagcgcaccggcgaccgatggtagcggcacccgcgtgggtggaccgtggcgtggaaaaacaactatcgtaacg
cgcatagcgcgaccacctggctggtgccagatgtgggtggcggaagcgcgcattaacaccagtggtgctgaccagcggcacc
accgaagcgaacgcgtggaaaagcacctggtgggccatgatactttaccaaagtgaaccgagcgcggcgagcgcgtagc

T7 RNAP (CAI: 0,98; GC-Gehalt: 54%)

atgaacaccattaacatcgcaaaaaacgatttcagcgatattgaactggccgcgattccgtttaacaccctggccgatcattatggcga
acgtctggcccgtaacagctggccctggaacatgaaagctatgaaatggcggaagcgcgttttcgtaaaatgtttgaacgtcagctg
aaagcgggcgaagtggcggataacgcagcggcgaaaccgctgattaccaccctgctgccgaaaatgattgcgcgtatcaacgatt
gggtcgaagaagtgaagcgaacgcggcgaacgtccgaccgcgtttcagtttctgcaggaaattaaaccggaagcgggtggcgtat
attaccattaaaaccaccctggcctgacctgaccgcggataaacaccagctgcaggcgggttgcgagcaggttgcacgtgacgtgatt
gaagatgaagcgcgctttggcgtattctgctgatctggaagcgaacattcaaaaaaacgttgaagaacagctgaacgtgaacgtgt
gggccacgtgtataaaaaagcgtttatgcaggtggtggaagcggatgctgtctaaaggcctgctggggtggaagcgtggagca
gctggcataaagaagatagcattcacgttggcgtgctgttcattgaaatgctgattgaaagcaccggcatggtgagcctgcatcgtca
gaacgcggggtggtgggcccagatagcgaaccatcgaactggccccgaatatgcggaagcgttgcgaccctgctgggtgc
gctggccggtattagccgatgtttcagccgtgtgtggtgccgcccgaaccgtggaccggcattaccggcggtggtattggcgcaac
ggcgtcgtccgtggccctggtgctgacctatagcaaaaaagcgtgatgctgttatgaagatgtgtatatgccggaagtgtataaag
cgattaacattgcgcagaacaccgcgtggaatatcaacaaaaaagtgtggtggcgtggcgaacgtgattaccaatggaacattg
cccgttgaagatattccggcgattgaacgtgaagaactgccgatgaaaccggaagatatgatgaatccggaagcgtgacc
gcttgaacgtgcccagcggcggtgtatcgtaagataaagcgcgtaaagccgtctattagcctggaatttatgctggaacag
gcgaacaaatttgcgaaccataaagcgatttgggtcccgataacatggattggcgtggccgtgtgtatgcggtgagcatgttaacccg
cagggaacgatatgaccaaaggctgctgaccctggccaaaggcaaacgattggcaagaaggctattactggctgaaaattc
atggcgcgaactgcgcgggtgtggataaagtgcggttccggaacgcattaaattcatcgaagaaaaccacgaaaacattatggcgt
gcgcgaaaagcccgtggaaaatacctggtggcggaacaggatagcccgttttcttctggccttttcttgaatatgcgggcgtgc
agcatcatggcctgagctataactgcagcctgccgtggcctttagggcagctgcagcggcattcagcattttagcgcgatgctcgt
gatgaagtggcggtgctgctggtgaatctgctgccgagcgaaccgtgcaggatatttatggcatcgtggcgaaaaagtgaaacga
aattctgcaggcggatgcgattaacggcaccgataacgaagtggtagccgtgaccgatgaaaacaccggcgaaattagcgaaaa

agtgaaactgggcaccaaagcgctggccggccaatggctggcctatggcgtgacccgtagcgtgaccaaacgtagcgtgatgacc
 ctggcctatggtagcaaagaatttggcttctgctcagcaggtgctggaagataaccattcagccggcgattgatagcggcaaaggcctga
 tgttaccagccgaaccaggcagcgggctatatggcgaaactgattgggaaagcgtgagcgtgacccgtggttgcggcgggtggaa
 gcgatgaattggctgaaaagcgcggcgaaactgctggccgcggaagtgaagataaaaaaacgggtgaaattctgcgtaaacggt
 gcgcggtgcattgggtgaccccgatggcttccggtgtggcaggaataaaaaaacgattcagaccgctgaacctgatgttctg
 ggccagttctgctgcagccgaccattaacaccaacaaagatagcgaaatcgatgcgcataaacaggaaagcggcattgcgccga
 actttgtcatagccaggatggcagccatctgcgtaaaaccgtggtgtggcgcatgaaaaatggcatcgaaagcttcgcgctgat
 tcatgatagcttggcaccattccggcggtatgcggcgaaacctgtttaaagcgggtgcgtgaaacctggtggatacctacgaaagctgc
 gatgtgctggccgattttatgatcagtttgcggatcagctgcatgaaagccagctggataaaatgccggcgctgccggcgaaaggca
 acctgaacctgcgtgatattctggaaagcgattttgcgttgcattga

7.3 Templates

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Templates in der NASBA und den kombinierten Ansätzen aus NASBA und PURE System

Bezeichnung	Templatelänge	Länge des NASBA-Produkts
GFP	1089 bp	868 bp
MMuLV RT	2490 bp	2347 bp
MMuLV RT_GC	2490 bp	2347 bp
Renilla	1305 bp	1132 bp
Renilla-MMuLV RT_GC	3364 bp	3211 bp
Yes1wt-MMuLV RT	2670 bp	2507 bp
Yes1mut-MMuLV RT	2670 bp	2507 bp